

Untersuchung zum Stoffwechselverhalten
von
Biopterin und Tetrahydrobiopterin
bei der Ratte

HEINZ METZGER

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555204_0013

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
(Direktor: Professor Dr. A. Butenandt)

Untersuchung zum Stoffwechselverhalten
von
Biopterin und Tetrahydrobiopterin
bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Heinz Metzger
aus
Merseburg

1965



1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Butenandt
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.1965

Vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. A. Butenandt

danke ich für die wohlwollende und großzügige Förderung dieser Arbeit sehr herzlich.

Herrn Dr. H. Rembold bin ich für seine zahlreichen Anregungen und sein ständiges Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, sehr dankbar, vor allem aber für die vielen Diskussionen in Zeiten, als ein Ergebnis noch in weiter Ferne lag.

1. Einleitung

2. Meine Eltern

1. Meine Eltern
2. Meine Eltern
3. Meine Eltern

Meinen Eltern

3. Meine Eltern

1. Meine Eltern
2. Meine Eltern
3. Meine Eltern

4. Meine Eltern

1. Meine Eltern
2. Meine Eltern
3. Meine Eltern
4. Meine Eltern
5. Meine Eltern
6. Meine Eltern
7. Meine Eltern

5. Meine Eltern

1. Meine Eltern
2. Meine Eltern
3. Meine Eltern
4. Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

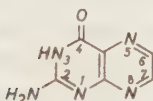
	Seite
<u>1. Einleitung und Problemstellung</u>	1
<u>2. Synthese von Biopterin</u>	3
.1 Eigenschaften des Biopterins und seine Reindarstellung	3
.2 Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Biopterinausbeute	10
.3 Synthese von (8a- ¹⁴ C)Biopterin und -7-Biopterin	11
<u>3. Stoffwechselverhalten von Biopterin bei der Ratte</u>	13
.1 Resorptions- und Ausscheidungsverhalten bei der Ratte	14
.2 Verteilung des applizierten Biopterins auf die Organe	16
.3 Biopterinaufnahme stark proliferierender Zellen	17
<u>4. Stoffwechselverhalten von Biopterin in vivo</u>	18
.1 Chemische Stabilität von Biopterin	18
.2 Aufarbeitung von Rattenlebern	19
.21 Vorbereitung	19
.22 Gewinnung des Rohextraktes	19
.3 Chromatographie des Extraktes	20
.4 Hydrolyse einer ganzen Rattenleber	21
.5 Untersuchung des mit Trichloressigsäure fällbaren Anteils der Rattenleber auf Pterine	22
<u>5. Stoffwechselverhalten von Biopterin in vitro</u>	22
.1 Problematik	22
.2 Das reproduzierbare Verhalten von Substanzen auf Austausch-Säulen	23
.3 Nullversuche	24

	Seite
.4 Verhalten von Biopterin in vitro	25
.5 In vitro-Versuche mit anderen Organhomogenaten als der Leber	26
.6 Die Struktur des Stoffes $R_E^{1\%AS} = 7.8$	27
.7 Beteiligung einzelner Zellfraktionen an der Biopterinoxidation	28
<u>6. Chemie und Biochemie des hydrierten Biopterins</u>	29
.1 Natürlich vorkommende Vertreter hydrierter Pterine	29
.2 Darstellung hydrierten Biopterins	30
<u>7. Stoffwechselverhalten von Tetrahydrobiopterin in vitro</u>	35
.1 Isolierung eines chromatographischen Gipfels	35
.2 Untersuchung von S	39
.3 Verhalten von 6-Hydroxylumazin im enzymatischen Ansatz	41
<u>8. Diskussion</u>	43
<u>9. Zusammenfassung</u>	47
<u>10. Experimenteller Teil</u>	49
.01 Verwendete Ionenaustauscher	49
.021 Präparation der Cellulose-Austauschersäulen	49
.022 Präparation der Dowex-Säulen	50
.03 Darstellung und Reinigung des Biopterins	50
.04 Radiosynthese von Biopterin und 7-Biopterin	52
.05 Spezielles	54
.051 Absorptionsmessungen	54
.052 Bestimmung der Radioaktivität	54
.053 Papierchromatographische Systeme	54
.054 Crithidia-Test	54
.055 Weitere wichtige Geräte	54
.056 Oxidation von Pterinen zu Pterin-Carbonsäure	54

	Seite
.057 Reinigung der Pterine über A-Kohle	55
.06 Aufarbeitung von Rattenlebern	55
.07 Inkubationsansätze und Isolierung der Umsetzungs- produkte	56
.08 Zellfraktionierung, Aufarbeitung auf Enzyme	57
.09 Reduktion von Biopterin	59
.10 Synthese der Lumazinderivate	59
<u>Literaturverzeichnis</u>	60

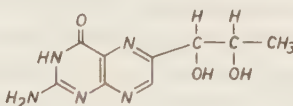
1. Einleitung und Problemstellung

Biopterin wurde 1955 (1) aus menschlichem Harn isoliert und in seiner Struktur als 2-Amino-4-hydroxy-6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)-pteridin erkannt.



Pterin =

2-Amino-4-hydroxy-pteridin



Biopterin =

6-(L-Erythro-1,2-dihydroxy-propyl)-
pterin

Mehrere Forschergruppen fanden diesen offenbar weit verbreiteten Stoff in Fischen (2), Amphibien (3) und in Insekten (4). Eine wesentliche Voraussetzung für seinen Nachweis und seine Isolierung bildete ein biologischer Test (5), der darauf beruht, daß Biopterin einen essentiellen Nahrungsfaktor für die Flagellate *Crithidia fasciculata* darstellt. Eine Konzentration von 2.5×10^{-5} γ /ml Nährlösung führt bei diesem Mikroorganismus (6) zu halboptimalem Wachstum. Diese biologische Aktivität und der folgende Befund liessen vermuten, daß es sich bei diesem Stoff um den ersten Vertreter der unkonjugierten Pterine (2-Amino-4-hydroxy-pteridine) mit speziellen biologischen Funktionen handelt: 1958 entdeckten A. Butenandt und H. Rembold (7) bei der vergleichenden Analyse von Arbeiterinnen- und Weiselzellen-Futtersaft, daß in letzterem Biopterin in wesentlich höherer Konzentration vorhanden ist und einen der wenigen Unterschiede zwischen den beiden Futtersäften bildet. Dieser Befund ist für die Frage, welches stoffliche Prinzip der Determination von jungen Bienenlarven zu Königinnen zugrunde liegt, von besonderer Bedeutung (7a).

Nach neueren Ergebnissen (8) bildet Biopterin allein nicht das determinierende Prinzip; seine Rolle im Weiselfuttersaft ist weiterhin unbekannt.

Pterine wurden zuerst bei der Untersuchung von Flügelpigmenten der Schmetterlinge (9), beim gelben Farbstoff aus den Flügeln des Zitronenfalters und beim weissen Pigment aus den Flügeln des Kohlweisslings aufgefunden. R. Purrmann (10) konnte 1940 zeigen, daß beide Pigmente ein und dasselbe Grundskelett des Pyrimido-(4,5 b)-pyrazins enthalten, das H. Wieland 1941 (11) Pteridin nannte.

In den letzten Jahren bemühten sich mehrere Arbeitskreise um die biologischen Funktionen des Biopterins. Nachdem H.S. Forrest 1958 in der Blaualge *Anacystis nidulans* (12) ein Biopterinlucosid und 1961 einige durch den Kohlenhydratanteil unterschiedene Biopterin-Glycoside beschrieb, nachdem ab 1960 in äusserst lichtempfindlichen Verbindungen in den Augen von Insekten, den Augen und der Haut von Amphibien und Fischen und in Algen ein Tetrahydrobiopterin vermutet wurde (13) und nachdem es gelang, im photolabilen Tetrahydrobiopterinderivat Ribose und Phosphat nachzuweisen (14), sah man die biologisch aktive Form des Biopterins als Ribosidphosphat an.

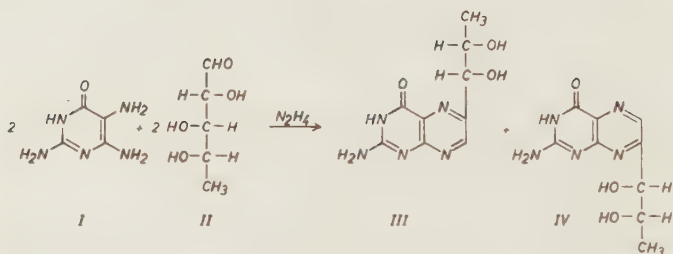
Einen anderen Impuls verdankt die Biopterinforschung S. Kaufman (15). Er entdeckte ein Enzymsystem, das Phenylalanin in Tyrosin umwandelt, und fand bei der Untersuchung der für diese Reaktion benötigten Coenzyme, daß Sepiapterin eine recht gute, mit Zink/Salzsäure reduziertes Biopterin eine noch bessere Cofaktorwirkung entfalten. Er schloß daraus auf ein Tetrahydro-/Dihydro-Biopterin-System, das für die Hydroxylierung des Phenylalanins verantwortlich sei.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst nach einem Verfahren gesucht, das es gestattet, die bis dahin nur sehr unrein zur Verfügung stehenden 6-Polyhydroxyalkylpterine rein darzustellen, denn erst durch Verwendung reiner Stoffe lassen sich Unsicherheiten beim Arbeiten in biologischen Systemen ausschliessen. Als "biologisches" System wurde zunächst der Organismus der Ratte gewählt, der Biopterin in Mengen von täglich 40-80 γ im Harn ausscheidet (16). Zur Vereinfachung der Untersuchungen und zur besseren Auswertung der Ergebnisse wurde ein Biopterin mit der spezifischen Aktivität von 1 mC/mMol synthetisiert, das in Stellung 8a radioaktiv markiert ist. Da die in vivo-Versuche keine klaren Ergebnisse lieferten, wurden die Arbeiten nach Voruntersuchungen an lebenden Ratten auf in vitro-Systeme umgestellt. Biopterin entfaltet im Crithidia-Test auch ohne Hydrierung seine volle Wuchsstoffaktivität; auch im Weiselfuttersaft liegt Biopterin als solches in freier Form vor. Deshalb beschäftigt sich ein großer Teil der Arbeit mit dem Stoffwechselverhalten der Grundsubstanz Biopterin selbst. Im letzten Teil der vorliegenden Untersuchung wird das Verhalten von hydriertem Biopterin beschrieben. -

2. Synthese von Biopterin

2.1 Eigenschaften des Biopterins und seine Reindarstellung

Biopterin ist ein 6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)-pterin (I). Zu seiner Darstellung kondensiert man 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (I) mit 5-Desoxy-L-arabinose (II) in Gegenwart von Hydrazin. Bei dieser Kondensation entsteht neben Biopterin (III) in wesentlich grösserer Menge auch dessen 7-Isomeres (IV).



Lediglich bei Kondensation des Pyrimidins I mit Hexosen entstehen 6-Polyhydroxyalkyl-pterine als Hauptprodukte, wie dies Petering und Schmitt (17) 1949 zeigten. Versuche einer gerichteten Synthese (18) führten nur zu 4-Aminoglykosiden des Pyrimidins I, deren Stabilität aber zu gering ist, um sie zu Pterinen zu cyclisieren.

Biopterin und sein 7-Isomeres verhalten sich papierchromatographisch in den verschiedensten Systemen völlig identisch, so daß eine Trennung auf diesem Wege nicht möglich ist. Zur Trennung der "Biopterin-Isomeren" wurden sehr viele Wege versucht. E.L. Patterson und Mitarb. (1) reinigten das Rohprodukt durch fraktionierte Fällung, Chromatographie an einer Magnesol-Celite-Säule und anschließende Chromatographie an Dowex 50. Sie erhielten auf diesem Wege, wie ein Vergleich der UV-Spektren zeigt, ein an Biopterin angereichertes Produkt. Eine Abtrennung des Isomerengemisches aus dem Roh-Kondensationsprodukt erhielten M. Viscontini und H. Raschig (19) durch Chromatographie auf einer Cellulose-Säule mit 3%iger Ammonchloridlösung. Die Verteilungschromatographie auf Aluminiumoxyd im System 80% Methanol/20% Wasser (7) erlaubt bei geringer Kapazität ebenfalls nur eine Anreicherung an Biopterin. R. Tschesche und Mitarb. (20) beschrieben eine Isomerentrennung durch Verteilungschroma-

tographie an Kieselgel im System 90% Methanol/9% Wasser/1% konz. Ammoniaklösung. 7-Biopterin wurde anschliessend durch eine zweite Verteilungschromatographie auf Cellulosepulver im System n-Butanol/wässr. Ammoniak/Pyridin von Begleitstoffen abgetrennt. Dieses Verfahren führt zwar zu einer recht guten Anreicherung in Bezug auf Biopterin, das 7-Isomere läßt sich jedoch auf diesem Wege nicht rein darstellen⁺).

Es gelang eine gute Trennung der Isomeren durch Verwendung von Ionenaustauschern auf Cellulosebasis; am wirkungsvollsten erwies sich der Kationenaustauscher P-Cellulose (Serva, Schleicher und Schüll). Dieses Verfahren erlaubt eine schonende Trennung der "Biopterin-Isomeren" voneinander und auch von den Begleitstoffen. Als Elutionsmittel wird destilliertes Wasser verwendet. Die beiden "Biopterin-Isomeren" unterscheiden sich recht befriedigend in ihren spezifischen Retentionsvolumina (Quotient aus Retentionsvolumen der Substanz zu Volumen des Ionenaustauschers in der Glassäule), die auf frisch hergestellten Säulen für Biopterin 13 und für 7-Biopterin 15 betragen. Eine zweifache Rechromatographie liefert die Isomeren in sehr reiner Form. Die papierchromatographische Untersuchung und der Abbau zu den Pterin-Carbonsäuren zeigen, daß sich die "Biopterin-Isomeren" nach dem beschriebenen Verfahren in reiner, völlig einheitlicher Form gewinnen lassen.

So wenig sich dieses Isomerenpaar in verteilungschromatographischer Hinsicht voneinander unterscheidet, so deutlich ist der Unterschied in den UV-Spektren. Gemessen in Wasser zeigt sich eine, schwach bathochrome Verschiebung der beiden

⁺) Herrn Prof. Tschesche, Organisch-chemisches Institut der Universität Bonn, danke ich für die Überlassung von je 1 mg Biopterin und 7-Biopterin zu Vergleichszwecken.

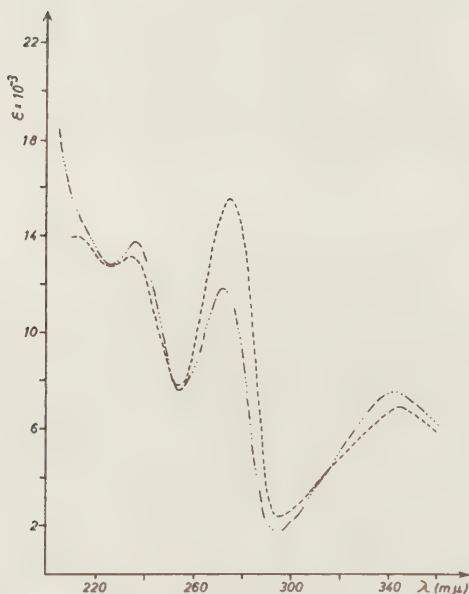


Abb. 1 Spektrum des Biopterins (----) und des 7-Biopterins (--..--) in Wasser

längerwelligen Maxima des Biopterins; vor allem fallen die starken Unterschiede in den molaren Extinktionen um 270 $m\mu$ auf. Unter Ausnutzung dieser Unterschiede wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das es gestattet, die beiden reinen Isomeren bereits in den chromatographischen Fraktionen durch Vergleich ihrer UV-Absorptionen zu identifizieren und quantitativ (s. nächstes Kapitel) zu bestimmen. Man verfolgt beim Retentionsvolumen des Biopterins den Quotientenverlauf, der sich aus dem Verhältnis der UV-Absorption bei einer Wellenlänge mit großem Unterschied in der Molextinktion zur Absorption bei einem isosbestischen Punkt ergibt.

Gut geeignet erweist sich der Quotient aus $E_{272}/E_{252} \text{ m}\mu$, der für Biopterin den Wert 1.92, für 7-Biopterin den Wert 1.48 besitzt.

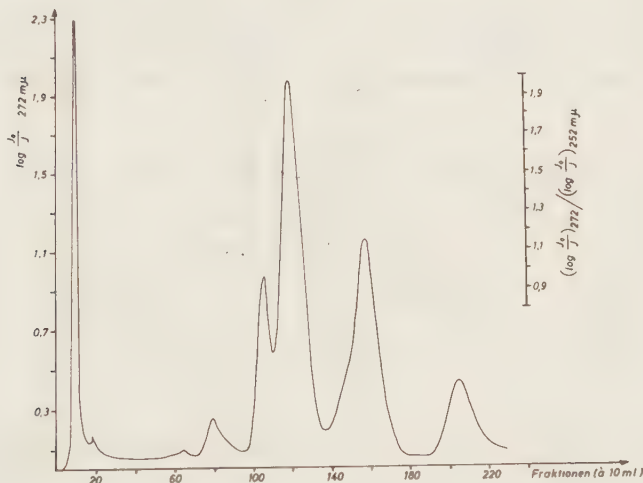


Abb. 2 Chromatographie von Roh-Biopterin $(\log \frac{J_0}{J})_{272 \text{ m}\mu}$ —
 $(\log \frac{J_0}{J})_{272} / (\log \frac{J_0}{J})_{252 \text{ m}\mu}$

Abbildung 2 zeigt die Auswertung einer Trennung von 20 mg Roh-Biopterin auf einer P-Cellulosesäule (Durchmesser 18 mm, Höhe 310 mm); gesammelt wurden 10 ml-Fractionen. Mit der Front werden neutrale und saure Anteile, u.a. Pterin-Carbonsäure-(6) und -(7) eluiert. Ab Fraktion 70 erscheint ein für Polyhydroxy-alkylpterine charakteristisches Zersetzungsprodukt, ab Fraktion 95 wird Biopterin, ab Fraktion 110 7-Biopterin eluiert. Der Quotient aus $E_{272}/E_{252} \text{ m}\mu$ ist bei den reinen Isomeren konstant und zeigt, wie gut diese mit einer kurzen Übergangszone aufgetrennt werden. Die darauf folgenden Zonen enthalten bei der Kondensation entstandene,

stärker basische Nebenprodukte. Durch mehrfache Chromatographie wurden die beiden Isomeren vollkommen rein in weissen Kristallen gewonnen. Ihre UV-Spektren sind in Säure und Alkali deutlich verschieden (Abb. 3). Besonders charakteristisch ist die Absorptionsbande bei 247 m μ (0,1 n HCl), die bei 7-Biopterin nur noch als Schulter erkennbar ist. Das langwellige Maximum des Biopterins ist im Sauren

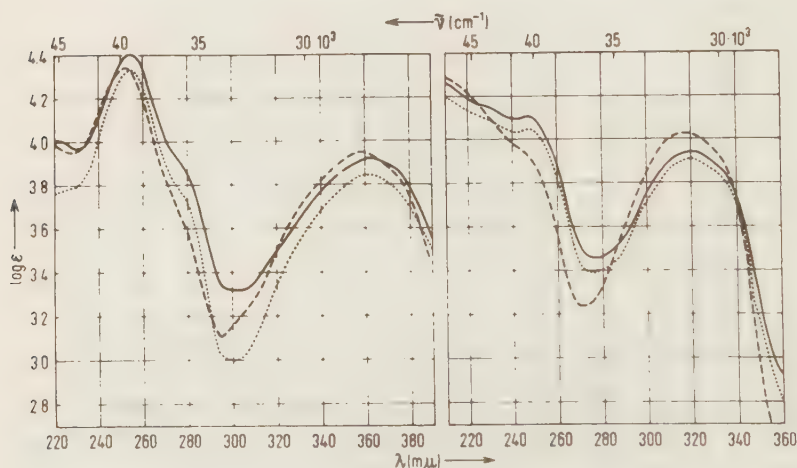


Abb. 3 Vergleich der UV-Spektren von natürlichem (....) und synthetischem Biopterin (—) und von 7-Biopterin (----) in 0,1 n HCl (rechts) und (0,1 n) NaOH (links)

und Alkalischen schwach bathochrom verschoben, die Mol-extinktionen sind stark verschieden. Die UV-Daten und die spezifischen Drehwerte der Isomeren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1 UV-Maxima⁺⁾ und Werte der optischen Drehung von synthetischem Biopterin und 7-Biopterin

	Biopterin		7-Biopterin	
	$\lambda_{\max}$	$\log \epsilon$	$\lambda_{\max}$	$\log \epsilon$
0.1 n NaOH	217 m μ	4.021	251.5 m μ	4.335
	254	4.399		
	362	3.919	359	3.940
0.1 n HCl	207	4.267	209.5	4.281
	247	4.102		
	320	3.942	317	4.023
$[\alpha]_D^{25}$	- 59 $\pm$ 3 ^o	(c=0.42)	- 11 $\pm$ 3 ^o	(c=0.22)

Biopterin ergibt im Crithidia-Test (21) halboptimales Wachstum bei einer Konzentration von 2.5×10^{-5} γ /ml Nährmedium, 7-Biopterin ist auch bei 1000-fach höherer Konzentration kein Wachstumsstoff und hemmt die Wachstumswirkung des Biopterins nicht⁺⁺⁾. Eine sehr geringe Wachstumsstoffaktivität des 7-Biopterins rührt von Verunreinigungen an Biopterin her; das auf dem beschriebenen Wege erhaltene 7-Biopterin erwies sich als mindestens 99,95%ig. Das synthetische 6-Isomere ist in seinem UV-Spektrum (Abb. 3), wie auch in den R_f -Werten in vier papierchromatographischen Systemen (exptl. Teil 10.053) mit natürlichem, aus Weiselfuttersaft gewonnenem Biopterin⁺⁺⁺⁾ identisch (22).

+) Fräulein I. Ehrhardt danke ich für die Aufnahme der UV-Spektren.

++) Fräulein G. Rädcl danke ich für die sorgfältige Durchführung der Teste.

+++) Herrn Dr. H. Rembold bin ich für die Überlassung natürlichen Biopterins sehr dankbar.

Tab. 2 Papierchromatographischer Vergleich von synthetischem und natürlichem Biopterin

System	R _f -Werte von	
	natürlichem	synthetischem
	Biopterin	
a	0.28	0.28
b	0.62	0.62
c	0.59	0.59
d	0.32	0.32

2.2 Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Biopterin- ausbeute

Die beschriebene Auftrennung von Roh-Biopterin an P-Cellulose erlaubt eine relativ einfach durchzuführende Ausbeutebestimmung. Es genügt, die beide Isomere enthaltenden Zonen von den übrigen Begleitstoffen abzutrennen und von einem Aliquot dieses Gemisches den Quotienten $E_{272}/E_{252} \text{ m}\mu$ zu bestimmen. Man vergleicht einen Bereich großer Unterschiede in der Molextinktion (272 m μ) mit einem solchen gleicher Extinktion (isosbestischer Punkt bei 252 m μ) und erhält daraus eine lineare Abhängigkeit für das Isomerenverhältnis zwischen den beiden Endwerten 1.92 (100% Biopterin) und 1.48 (100% 7-Biopterin). Dieses Verfahren erfordert einen geringen Arbeitsaufwand und ist mit einem möglichen Fehler von $\pm 5\%$ wesentlich genauer als das Verfahren der Isomerenbestimmung durch Abbau zu den entsprechenden 6- bzw. 7-Carbonsäuren, anschliessende papierchromatographische Auftrennung und Absorptionsmessung der eluierten Pterin-Carbonsäuren (20). Aus der UV-Absorption bei 252 m μ läßt sich ferner die Gesamtkonzentration der Lösung an "Biopterin-Isomeren" bestimmen:

$$c \text{ (Biopterin + 7-Biopterin)} = 0.03 E_{252 \text{ m}\mu} \text{ (mg/ml)}$$

Für die Ausbeutebestimmung wird jeweils ein Aliquot der Reaktionslösung auf P-Cellulose aufgetrennt. Dieses Verfahren erlaubt eine absolute Ausbeutebestimmung, da auch die in der Mutterlauge vorhandenen Pterine miterfaßt werden. Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß für die Kondensation der Partner I und II zum Biopterin sowohl Hydrazin als auch Säure nötig sind. Wenn eine oder beide dieser Komponenten fehlen, entsteht Biopterin nur in Spuren, und eine als Nebenprodukt immer entstehende Substanz, die in Abbildung 2 zwischen den Fraktionen 140 und 175 erscheint, wird zum Hauptprodukt der Reaktion. Wird die Essigsäurekonzentration in Gegenwart von Hydrazin variiert, so ändert sich die Gesamtausbeute an beiden Isomeren nur wenig, der Biopterinanteil variiert aber deutlich. Die optimalen Reaktionsbedingungen liegen bei einer Kondensation in 20%iger Essigsäure. Eine höhere Säurekonzentration verschlechtert, wahrscheinlich durch Salzbildung mit der 5-Aminogruppe des Pyrimidins I, die Biopterinausbeute. Bei Kondensation in 2n Salzsäure fiel beim Abkühlen und Neutralisieren der Reaktionslösung keine Substanz mehr aus. Versuche, die 5-Aminogruppe durch Zusatz von Aceton intermediär zu blockieren, um so die Reaktion bevorzugt zum Biopterin zu leiten, waren erfolglos. Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 25 Minuten auf 4.5 Stunden führte zu einer Verschlechterung der Ausbeute, dafür bildete sich in grösseren Mengen das auch bei Kondensation ohne Hydrazin entstehende Nebenprodukt. Stellt man zunächst das Hydrazon der Methyltetrose dar, indem man den Zucker 15 Minuten lang in der Hitze mit Hydrazinhydrat reagieren läßt, spaltet anschließend durch Erhitzen in 20%iger Essigsäure bei 95°C und gibt nach 30 Minuten das Pyrimidin I zu, so ändert sich zwar das Isomerenverhältnis zu Gunsten des Biopterins, gleichzeitig nimmt aber die Gesamtausbeute beträchtlich ab. Bemerkenswert ist ferner die wesentlich geringere Ausbeute bei einer Kondensation in Acetat-Puffer, einem Verfahren, nach dem die Polyhydroxyalkylpterine üblicherweise synthetisiert werden.

Tab. 3 Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Kondensation von 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (THP) mit 5-Desoxy-L-arabinose. a = Spaltung des Zuckerhydrazons mit 20%iger Essigsäure bei 95°, nach 30' Zugabe von THP-Sulfat; b = Reaktionszeit 4.5 Stdn. Alle anderen Versuche wurden unter Standardbedingungen ausgeführt.

Zusatz von N_2H_4 H_2O	Reaktions- medium	Ausbeute in %, bezogen auf THP-Sulfat		% Biopterin im Isomerenge- misch
		an Isomeren- gemisch	an Biopterin	
-	Wasser	Spuren		
-	10% Essigsre.	Spuren		
-	20% Essigsre.	2.5		
+	Wasser	Spuren		
+	10% Essigsre.	32	6	19
+	20% Essigsre.	33	7	21
+	10% "/10% Aceton	33	6	18
+	20% "/10% Aceton	35	7	20
+	50% "/10% Aceton	35	5	14
+	20% "/ a	20	5	25
+	20% "/ b	16		
+	1m Na-acetat- Puffer pH 4.0	20	3.5	17

2.3 Synthese von (8a-¹⁴C)Biopterin und (8a-¹⁴C) 7-Biopterin

Das für die Synthese benötigte (4-¹⁴C) 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidinsulfat wurde, ausgehend von $K^{14}CN$ in einem vereinfachten Verfahren nach F. Korte und H. Barkemeyer (23), W. Traube (24), sowie C.K. Cain und Mitarb. (25) dargestellt. 5-Desoxy-L-arabinose wurde durch Abbau der L-Rhamnose nach

D.L. Mac Donald und H.O.L. Fischer (26) mit der Modifizierung von E.L. Patterson und Mitarb. (1) gewonnen. Durch Kondensation in 20%iger Essigsäure und chromatographische Reinigung auf dem beschriebenen Wege wurden 2.4 mg (8α - ^{14}C)Biopterin (0.5% d.Th., bezogen auf KCN) und 7.7 mg reines (8α - ^{14}C) 7-Biopterin (1.6% d.Th.) mit einer spezifischen Aktivität von 1 mC/mMol erhalten.

3. Stoffwechselverhalten von Biopterin

Biopterin kommt, wie schon erwähnt, in größerer Menge im Weiselfuttersaft vor (7). Seine biologische Bedeutung wird durch den Befund erhellt, daß es für die Flagellate *Crithidia fasciculata* einen wichtigen Nahrungsfaktor darstellt (5). Zum Verhalten des Biopterins im Stoffwechsel der Taufliege *Drosophila* sind 1961 von H. Rembold (27) Versuche angestellt worden, die ähnliche Ergebnisse lieferten wie diejenigen bei Bienenlarven: Biopterin stellte sich bei diesen Insekten als recht stoffwechselstabil heraus. Bei Applikation von (2 - ^{14}C) Biopterin waren weder die Drosopterine noch die Sepiapterine oder andere verwandte Heterocyclen Folgeprodukte des Biopterin-Stoffwechsels. Bis zu 60% der aus den *Drosophila*-Fliegen zurückgewonnenen radioaktiven Pterine waren unverändertes Biopterin und sein Lichtzersetzungsprodukt (28).

Die äußerst geringen Biopterinmengen, die *Crithidia* zu ihrem Wachstum benötigt, lassen daran denken, daß es auch bei anderen Organismen als Vitamin wirkt. Versuche, mit biopterinfreiem Futter bei Ratten einen Biopterinmangel zu erzeugen (16), führten jedoch zu keiner Mangelkrankheit. Die Ratten schieden weiterhin Biopterin in Mengen von 40-80 γ /Tag mit dem Harn aus, je nach Alter und Größe der Tiere. Sie synthetisieren offenbar Biopterin in ausreichender Menge.

3.1 Resorptions- und Ausscheidungsverhalten von Biopterin bei der Ratte

Wichtige Hinweise auf die Bedeutung von Stoffen für den tierischen Organismus erhält man durch die Untersuchung ihres Aufnahme- bzw. Ausscheidungsverhaltens. Die Substanzen können entweder injiziert oder (z.B. mit der Schlundsonde) verfüttert werden. Das Ausscheidungsverhalten kann einen Hinweis darauf geben, ob das applizierte Produkt vom Organismus verarbeitet werden kann, ob es eines gewissen Umbaus der Verbindung bedarf, der auf dem Wege über den Verdauungstrakt stattfindet, oder ob ein Stoff, vorausgesetzt, daß der Gesamtzustand des Tieres über längere Zeit normal bleibt, im biologischen Sinn unbrauchbar ist. Nach Injektion wird eine Substanz zum großen Teil wieder ausgeschieden, wenn sie nicht verwendet werden kann. Wird eine Substanz umgebaut, so wird ihre Ausscheidung klein sein. Wird eine Verbindung nicht vom Darm aus resorbiert, wird sie nach oraler Applikation mit dem Kot ausgeschieden.

Nach Injektion einer Biopterinlösung in physiologischer Kochsalzlösung (es wurden 14 γ , gelöst in 1 ml, intraperitoneal oder subcutan injiziert) werden in beiden Fällen während der ersten 24 Stunden 84%, in weiteren 24 Stunden 6% der Radioaktivität im Harn gefunden. Die Gesamtausscheidung beträgt demnach 90%. Wurde Biopterin in physiologischer Kochsalzlösung per Schlundsonde gegeben, so betrug die Ausscheidung ungefähr 9% (Tabelle 4) der applizierten Radioaktivität.

Tab. 4 Ausscheidung der % Radioaktivität nach Ver-
fütterung von (8a-¹⁴C) Biopterin und -7-Biopterin
an Ratten.

	Kot	Harn	Kot	Harn
nach 24 Stdn.	3.7%	3.7%	43%	4.7%
nach 48 Stdn.	1.4%	0.3%	4%	-
	5.1%	4.0%	47%	4.7%
Summe	9.1%		51.7%	

Sehr interessant ist ein Vergleich mit dem im Crithidia-Test unwirksamen 7-Biopterin, dessen Ausscheidungswerte neben denen für Biopterin in Tabelle 4 angegeben sind; die Gesamtausscheidung betrug 51.7% Appliziert wurden in allen dargestellten Fällen je 14 γ (8a-¹⁴C)Biopterin bzw. 7-Biopterin (7×10^4 Ipm) an sechs Wochen alte, 120 g schwere weibliche Ratten der Stämme Wistar und Sprague Dawley. Neben der Analyse der Ausscheidungsprodukte im Harn und Kot wurde während 24 Stunden nach Verfütterung der radioaktiven Stoffe die Atemluft untersucht. Dazu wurde die Ratte in eine 5 l-Flasche gesetzt, in die Kohlendioxid-freie Luft eingeblasen und aus der die Atemluft durch 10%ige Natronlauge geleitet wurde. Das darin absorbierte Kohlendioxid wurde in Bariumcarbonat übergeführt und auf Radioaktivität untersucht. In keinem Fall wurde radioaktive Kohlensäure als Endprodukt eines Abbaus der applizierten Stoffe gefunden.

Bei Untersuchung des Harnes auf Stoffwechselprodukte von Biopterin (28) konnte festgestellt werden, daß 65% der Radioaktivität, die sich nach Applikation von (8a-¹⁴C)Biopterin im Harn befand, dem Biopterin zukam, während weitere 16% im Pterin (= 2-Amino-4-hydroxy-pteridin) zu finden waren. Dieser letzte Befund wird in einem späteren Teil der Arbeit erörtert.

3.2 Verteilung des applizierten Biopterins auf die Organe der Ratte

Über die Verteilung des Biopterins im Organismus der Ratte liegen Vorarbeiten von H. Rembold vor, der wasserlösliche Organextrakte auf ihre Aktivität im Crithidia-Test untersuchte. Da Biopterin in noch unbekannter Weise einen notwendigen Nahrungsfaktor für das Wachstum dieses Flagellaten darstellt, bezog er die Crithidiaaktivität auf entsprechende Mengen Biopterin, die das gleiche halboptimale Wachstum ergeben (28).

Tab. 5 Verteilung der Crithidia-Aktivität auf Organe der Ratte, bezogen auf γ Biopterin/g Organ.

Leber	6.0	Lunge	0.9	Serum	0.2
Nebenniere	4.8	Knochenmark	0.6	Augen	0.02
Milz	3.0	Gehirn	0.2		
Niere	1.2	Herz	0.2		

Es wurde geprüft, ob sich eine Parallele zwischen dieser Crithidia-Aktivität und dem Resorptionsverhalten des markierten Biopterins feststellen läßt. Ratten der Stämme Wistar, Sprague Dawley und BAL erhielten im Alter von 6 Wochen mit einem Gewicht von 120 g je 14 γ Biopterin (7×10^4 Ipm) per Schlundsonde. Drei Tage danach war die Ausscheidung radioaktiven Biopterins beendet (Kapitel 3.1) und die Tiere wurden getötet und ihre Organe auf Radioaktivität untersucht. Es erwies sich als gleichgültig, ob Organstücke in konzentrierter Ameisensäure gelöst auf Radioaktivität untersucht wurden oder ob der wasserlösliche, mit Trichloressigsäure nicht fällbare Anteil untersucht wurde. Das Ergebnis zeigt Tabelle 6.

Tab. 6 Radioaktivität von Organen der Ratte nach Verabreichung von 7×10^4 Ipm (8α - ^{14}C)Biopterin

Serum	220-330 Ipm/ml	Lungen	-
Leber	340-540 Ipm/Organ	Knochenmark	-
Nebennieren	50- 70 Ipm/Organ	Herz	-
Nieren	-	Milz	-
Schilddrüsen	-	Thymus	-
Augen	-	Gehirn	-

Von dem applizierten Biopterin konnte somit nur ein kleiner Teil wiedergefunden werden, in wenigen Organen lokalisiert. Die spezifische Aktivität, gemessen in Ipm/g Organ, war im Durchschnitt mit 2×10^3 in den Nebennieren wesentlich höher, als in der Leber mit einem Durchschnitt von 61 Ipm/g. Der größte Teil des (8α - ^{14}C)Biopterins scheint sich auf den gesamten Organismus verteilt zu haben. Die Ergebnisse aus dem Crithidia-Test entsprechen denen der "radioaktiven" Methode.

3.3 Biopterinaufnahme stark proliferierender Zellen

Biopterin kommt im Futtersaft jener Bienenlarven in höchster Konzentration vor, die das intensivste Wachstum haben, nämlich der Königinnenlarven. Es erhebt sich die Frage, ob die Biopterin-Konzentration in stark proliferierenden Zellen ebenfalls ansteigt. Ratten, deren Lebern operativ auf 50% des ursprünglichen Gewichtes reduziert wurden, erhielten sechs oder zwölf Stunden nach erfolgter Operation 17γ Biopterin (8.4×10^4 Ipm) verfüttert. Nach 12 Stunden bzw. nach drei Tagen fanden sich in der regenerierenden Leber 480 bzw. 510 Ipm. Der Biopterineinbau ist also gegenüber dem in der

normalen Leber nicht erhöht. Auch mit Ascites beimpfte Ratten zeigen bei Untersuchung des Leberkrebses auf Radioaktivität kein deutlicheres Bild, als die teilhepatektomierten Ratten.

4. Stoffwechselverhalten von Biopterin in vivo.

Nebennieren zeigen eine höhere spezifische Biopterinaktivität als die Leber. Zur Untersuchung auf mögliche Metaboliten ist jedoch die Leber ihres größeren Gewichtes wegen und dadurch auch ihrer absolut größeren Menge an Biopterin bzw. dessen Abkömmlingen besser geeignet. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen in der Hauptsache mit Leber durchgeführt.

4.1 Untersuchungen über die chemische Stabilität von Biopterin

Vor Beginn der Stoffwechseluntersuchungen mußte geklärt werden, wie stabil Biopterin selbst ist. Eine wässrige Biopterinlösung wurde zum Schutz gegen Pilzbefall mit Toluol überschichtet, während einer im Vergleich zu entsprechenden Biopterinuntersuchungen langen Zeit (6 Wochen) im Dämmerlicht gehalten und anschliessend über eine P-Cellulosesäule (27 x 200 mm) chromatographiert. 75% des anfänglich eingesetzten Biopterins waren noch völlig erhalten, weitere 10% waren zu Pterin-Carbonsäure oxydiert, die restlichen 15% verteilten sich auf zwei Pterine unbekannter Natur. Da Biopterin gegen eine so lange Belichtung weitgehend stabil ist, sind Befürchtungen, durch Dämmerlicht Zersetzungsprodukte von Biopterin in größerer Menge zu erhalten, ungerechtfertigt.

Zur Prüfung der Säurestabilität wurden, ebenfalls als Extremfall gedacht, 1 mg Biopterin mit 20 ml 5 n Salzsäure

10 Stunden lang im Dunklen unter Rückfluß gekocht. Aus diesem Ansatz konnten 52% des eingesetzten Biopterins zurückgewonnen werden, neben 16% Pterin-Carbonsäure. Die restlichen 32% verteilten sich auf die gleichen Produkte, die bei Lichtzersetzung entstanden.

4.2 Aufarbeitung von Rattenlebern auf mit Trichloressigsäure (TCE) fällbare und nicht fällbare Anteile

Während der Aufarbeitung von Rattenlebern kommt das Leberhomogenat nur kurzzeitig bei 4°C mit 5%iger TCE in Berührung, die bald darauf wieder mit Äther entfernt wird. Während dieser Zeit kann nach den Vorversuchen weder Biopterin durch Zersetzung verlorengehen, noch ist wahrscheinlich, daß eventuell vorliegende Phosphate oder Glykoside gespalten werden.

4.21 Vorbereitung

Zwei Ratten erhielten über je vier Tage täglich 20 γ (8 α -¹⁴C)Biopterin (1×10^5 Ipm) durch Schlundsonde verfüttert. Am fünften Tag wurden diese Ratten getötet, die Lebern herauspräpariert und mit 45 weiteren "inaktiven" Lebern aufgearbeitet.

4.22 Gewinnung des Rohextraktes

Die Isolierung der Pterine geschah nach der gleichen Methodik, nach der H. Rembold und L. Buschmann (29) Extrakte aus Bienenpuppen und Flugbienen zur Untersuchung auf Pterine gewonnen haben. Die in 4.21 erhaltenen 250 g Rattenlebern wurden in Eiswasser in einem Mixer homogenisiert, die festen Teile abzentrifugiert, erneut in Eiswasser homogenisiert und zentrifugiert (Protein A). Aus den vereinigten Überständen (C) fällte man mit TCE, die in fester Form unter kräftigem Rühren

zugegeben wurde, bis die Lösung daran 5%ig war, die löslichen Proteine (Proteinfraktion B). Alle im Rahmen der Aufarbeitung angefallenen Proteine (A und B) wurden im Anschluß daran zweimal mit 3%iger TCE bei 4°C homogenisiert, die daraus gewonnenen löslichen Bestandteile mit C vereinigt und mit Äther vorsichtig ausgeschüttelt, bis ein pH von 4 erreicht war. Der letzte Rest der Trichloressigsäure wurde dem Extrakt durch Perforieren mit Äther entzogen. Anschliessend rotierte man auf ein kleines Volumen ein. Die meßbare Radioaktivität befand sich im Überstand. Die erhaltenen Proteinfraktionen wurden nach 4.5 weiterverarbeitet.

4.3 Chromatographie des Extraktes

Das von Rembold und Buschmann (29) beschriebene Standardverfahren zur Isolierung von Pterinen aus Naturstoffextrakten ist fast streng reproduzierbar. Es läßt zu, noch unbekannte Pterine, soweit Aussagen über deren Eigenschaften möglich sind, einem bestimmten Bereich im Standardchromatogramm zuzuordnen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde mit besonderer Sorgfalt nach Pterinen gesucht, die im Rahmen der Pterin-Biosynthese immer wieder diskutiert werden, besonders nach Neopterin, 6-Hydroxymethylpterin und Pterin, von denen jedoch keines gefunden wurde. Isoxanthopterin und Violapterin, die in Bienenpuppen und Flugbienen (29) vorkommen, waren ebenfalls nicht anzutreffen.

Der wasserlösliche, mit TCE nicht fällbare Leberextrakt wurde über eine Dowex 1 X 8 Säule (20 x 440 mm, Formiatform) mit Hilfe der Gradientenelution (29) in Einzelfraktionen zerlegt. Die größte Menge der Radioaktivität erschien am Anfang der Chromatographie bei Elution mit Wasser an einer Stelle, wo stärker basische Stoffe als Biopterin im erwarteten Bereich isoliert werden. Die mit Wasser eluierte Radioaktivität

betrug 73% der Gesamtaktivität. Als einheitlicher Stoff verbargen sich darin 250 γ Biopterin (= 10% der Gesamtaktivität). Das vor dem Biopterin erschienene Eluat von 63% der Gesamtaktivität mußte jedoch der hohen Menge von Begleitstoffen wegen über mit 4% Stearinsäure desaktivierte A-Kohle gereinigt werden. Die von A-Kohle desorbierte Fraktion enthielt eine Vielzahl radioaktiver Stoffe, so daß anzunehmen ist, daß sich ein labiles Pterin unter den Bedingungen der Aufarbeitung zersetzt hat.

Im sauren Anteil der Chromatographie fanden sich Spuren von Pterin-Carbonsäure, aber kein Biopterinphosphat. Auch in diesem Teil des Chromatogramms konnte keine weitere Verbindung charakterisiert werden.

Die Untersuchung des löslichen, mit TCE nicht fällbaren Anteils der Leber hat somit gezeigt, daß das Pterinmuster an bekannten Pterinen äusserst gering ist. Es wurde lediglich Biopterin isoliert, Pterin-Carbonsäure trat nur in Spuren auf. Die Hauptmenge der Biopterinabkömmlinge kann auf diese Art nicht in Substanz erfaßt werden, da sie unter den Isolierungsbedingungen zu instabil sind.

4.4 Hydrolyse der ganzen Rattenleber und Untersuchung auf Biopterinfolgeprodukte

Zwei ebenfalls nach 4.21 vorbehandelte Rattenlebern wurden durch Kochen mit Salzsäure hydrolysiert. Das erhaltene Hydrolysat wurde über A-Kohle gereinigt und über eine Ecteola-Säule aufgetrennt. Nach Rechromatographie geeigneter Zonen über P-Cellulose zeigte sich, daß 45% der in der gesamten Leber vorhandenen Radioaktivität im Biopterin nachzuweisen ist. Das Biopterin-Folgeprodukt, welches in 4.3 isoliert worden war und sich unter alkalischen Bedingungen (die Elution von A-Kohle erfolgt mit konz. Phenollösung/konz. wässr. Ammoniak 4:1) zersetzte, scheint unter den sauren Bedingungen

dieses Ansatzes auf die Stufe des Biopterins zurückgefallen zu sein. Dieses wurde deshalb in größerer Menge als nach 4.3 erhalten.

4.5 Untersuchung des mit TCE fällbaren Leberproteins auf Pterine

Der mit TCE fällbare Anteil des Leberproteins wurde durch Kochen mit 5 n Salzsäure hydrolysiert. Aus diesem Extrakt wurden die Heterocyclus über mit 4% Stearinsäure desaktivierte A-Kohle abgetrennt und an Dowex 1 X 8 wie in Abschnitt 4.3 beschrieben fraktioniert. Es konnten keine Pterine gefunden werden. Die Pterine sind somit nicht in Struktur ein- bzw. fest angebaut.

5. Stoffwechselverhalten von Biopterin in vitro

5.1 Problematik

Neben in vivo-Versuchen, die sich im allgemeinen auf eine Untersuchung der Ausscheidungsprodukte beschränken, ist die Verwendung von Geweben und Gewebshomogenaten im in vitro-Versuch zur Klärung von Stoffwechselvorgängen ein in der Biochemie oft verwendetes Verfahren. Im einen Fall werden feinste Gewebsscheibchen in einem Puffer bei 37°C über eine gewisse Zeitspanne mit dem zu testenden Stoff inkubiert, wobei die angebotene Verbindung durch Diffusion ins Innere der Zelle gelangt, dort durch die darin befindlichen Enzyme umgesetzt wird, und die Zelle ins umgebende Medium verläßt. Diese Methodik bringt Ergebnisse, wie sie im in vivo-Versuch anzutreffen sein werden. Sie liefert aber nur geringe Umsatzraten, da der Diffusionsschritt der geschwindigkeitsbestimmende ist.

Im anderen Fall bedient man sich der Gewebshomogenate. Gewebeproben frisch getöteter Tiere enthalten noch die Enzyme, die in der lebenden Zelle die Stoffumwandlungen bewerkstelligen, ferner die dazu nötigen Zusatzstoffe. In den Gewebshomogenaten sind aber viele Enzyme von ihren Strukturen losgelöst. Angebotene Substrate durchlaufen keinen vorgegebenen Weg mehr wie in der Zelle; sie werden von den verschiedensten Enzymen, so weit diese es vermögen, verändert. Auf diese Weise werden neben den gewünschten und in vivo produzierten Umsatzprodukten auch in mehr oder weniger hohem Maße Stoffe erhalten, die in vivo nicht auftreten. Diese Methode ist durchaus geeignet, Stoffumwandlungen zu erhalten, es bleibt aber anschließend zu prüfen, in wieweit solche Stoffe auch in vivo eine Rolle spielen. Wichtig ist bei dieser Arbeitsmethodik ferner, diejenigen Zellteile zu isolieren, die für den Umsatz in erster Linie verantwortlich sind, und aus ihnen die eigentlichen Enzyme darzustellen.

5.2 Spezifische Retentionsvolumina, das reproduzierbare Verhalten einer Substanz auf Ionenaustauschersäulen

Auf den kommenden Seiten wird oft von $R_{PC}^{H_2O}$ - oder $R_E^{1\%AS}$ - Stoffen gesprochen. R bedeutet dabei das spezifische Retentionsvolumen und ist charakterisiert durch den Quotienten aus dem Retentionsvolumen im Maximum der Konzentration der eluierten Verbindung zu dem Volumen, welches das Ionenaustauschermaterial in der Glassäule einnimmt. Da der auf das tatsächliche Säulenvolumen bezogene Wert zwar etwas anders, jedoch ebenso konstant ist, wurde mit den scheinbaren Säulenvolumina gerechnet. Der Quotient hat sich in gewissen Grenzen als recht konstant erwiesen, wie sich auch bei Versuchen zur Isolierung der Biopterin-Isomeren und bei der reproduzierbaren Auftrennung von Naturstoffextrakten auf Dowex 1 X 8 (29) gezeigt hat. PC bzw. E bedeuten P-Cellulose und

Ecteola-Cellulose. Die Substanzen werden mit Wasser bzw. 1%iger Ameisensäure eluiert. $R_E^{1\%AS} = 1$ bedeutet, daß nach Wechsel des Elutionsmediums von Wasser auf 1%ige Ameisensäure bei einem Säulenvolumen von z.B. 100 ml (Ecteola) mit einem Retentionsvolumen der Substanz von 100 ml zu rechnen ist.

Die chemische Stabilität von Biopterin ist zwar, wie an anderer Stelle schon gezeigt wurde (4.1), recht beträchtlich. Wird aber bei einer Aufarbeitung Pterin-Carbonsäure gefunden, so taucht der Verdacht auf, sie könne in Gegenwart von Licht durch Oxydation von Polyhydroxyalkylpterinen entstanden sein. Es wurden deshalb alle weiteren Versuche bei dunklem Rotlicht durchgeführt.

5.3 Nullversuche

Eine wässrige Biopterinlösung wurde drei Stunden lang bei 37°C ständig leicht geschüttelt. Dann wurde der Ansatz, der für die folgenden Versuche als Blindversuch gewertet wird, auf einer Ecteola-Säule aufgetrennt. Mit $R_E^{H_2O} = 1.9$ wird Biopterin eluiert (Nachweis durch papierchromatographischen Vergleich mit authentischem Material und durch Rechromatographie auf P-Cellulose). Mit 1%iger Ameisensäure läßt sich von Ecteola ein zweiter Stoff mit $R_E^{1\%AS} = 2.1$ eluieren, der in 4 papierchromatographischen Systemen (exptl. Teil 10.053) folgende R_f -Werte hat: System a 0.07, b 0.50, c 0.46, e 0.11.

Dieser Stoff ist weder mit Pterin-Carbonsäure, noch mit Biopterin identisch. Er entsteht nicht bei gleicher Behandlung im Säuren, jedoch in großer Menge, wie später gezeigt wird, im Alkalischen. Da er ein unspezifisches Zersetzungsprodukt des Biopterins ist, wurde seiner Struktur nicht weiter nachgegangen. Für kommende Versuche ist er aber wichtig, weil er entsteht, wenn Biopterin in Puffer mit denaturiertem Protein inkubiert wird.

5.4 Verhalten von Biopterin in vitro

Im Rahmen der Fragestellung, wie weit Biopterin bei Inkubation mit Lebergewebe verändert wird, wurden Leberstücken in einem vorbereiteten Puffer (Tris/Salzsäure(T) oder Citrat/Phosphat(C/P)) von bestimmtem pH-Wert in einem Potter-Elvehjem (42) homogenisiert, in einen kleinen offenen Erlenmeyer überführt und bei 37°C drei Stunden lang mit zugesetztem (8a-¹⁴C)Biopterin inkubiert. Als Vergleichsversuche wurden die gleichen Experimente mit hitzedenaturiertem Leberprotein durchgeführt. Nach Hitzedenaturierung am Ende des Ansatzes wurde das Protein abzentrifugiert und zweimal mit warmem Wasser ausgewaschen. Das zurückgebliebene Protein zeigte weniger als 1.5% der eingesetzten Radioaktivität. Die vereinigten Überstände wurden auf einer Ecteola-Säule (16 x 210 mm) aufgetrennt. Die mit Wasser eluierten Kationen wurden auf einer P-Cellulosesäule (16 x 170 mm) rechromatographiert, wobei nur Biopterin mit $R_E^{H_2O} = 1.9$ als radioaktive Verbindung nachgewiesen werden konnte. Mit Ameisensäure konnte eine geringe Menge des Stoffes $R_E^{1\%AS} = 2.1$ eluiert werden, außerdem ein Stoff $R_E^{1\%AS} = 7.8$. Die Auswertung dieser Versuchsreihe zeigt Tabelle 7.

Die Inkubation von denaturiertem Leberprotein mit Biopterin führte zu dem Stoff $R_E^{1\%AS} = 7.8$ mit Ausbeuten <2%, ferner zu $R_E^{1\%AS} = 2.1$. Mit nativem Leberprotein entsteht $R_E^{1\%AS} = 7.8$ wenig abhängig vom pH in Mengen zwischen 3% und im Maximum bei pH 6.4 mit 8%. Andere Produkte konnten nicht nachgewiesen werden. Auch bei Erhöhung des mit Hitze nicht fällbaren Leberanteils oder bei Verlängerung der Inkubationsdauer zeigt sich keine Ausbeutesteigerung.

Tab. 7 Bei Inkubation von (8a-¹⁴C)Biopterin mit Leberhomogenat auftretende Metaboliten

pH	Medium	Bemerkung	R _E ^{1%AS} = 2.1 (% Ausbeute)	R _E ^{1%AS} = 7.8 (% Ausbeute)
0.8	HCl	-	-	-
3.7	C/P	-	-	6.4
4.6	C/P	-	-	6.4
6.4	C/P	-	-	7.5 - 8.0
7.1	C/P,T	-	-	3.0 - 5.0
8.8	T	-	95	5.0
12.3	NaOH	-	100	-
6.4	C/P	denat. Prot.	7.4	< 1.5
7.0	T	denat. Prot.	5.0	-
8.8	T	denat. Prot.	98	< 2

5.5 In vitro-Versuche mit anderen Organhomogenaten

In Tabelle 8 sind Versuche, an Stelle von Leberprotein das Protein der Nieren bzw. der Milz zu verwenden, im Vergleich zur Leber zusammengestellt. Diese Versuche führen zum qualitativ gleichen Ergebnis, wie es mit Leberhomogenat erhalten wird.

Tab. 8 Bei Inkubation von (8a-¹⁴C)Biopterin mit Organhomogenaten auftretende Metaboliten

pH	Puffer	Organ	R _E ^{1%AS} = 2.1 (% Ausbeute)	R _E ^{1%AS} = 7.8 (% Ausbeute)
6.4	C/P	Leber	-	7.5 - 8.0
6.3	C/P	Nieren	-	4.0
6.3	C/P	Milz	-	1.5

5.6 Die Struktur des Stoffes $R_E^{1\%AS} = 7.8$

Die Leber zeigt die höchste Umsatzrate zu dem sauren, von Ecteola eluierbaren Stoff. Umsatzraten von 8% machten es möglich, ihn in größerer Menge zu gewinnen und zu charakterisieren. Bei pH 6.4 wurden mehrere größere Ansätze durchgeführt und daraus die Zone $R_E^{1\%AS} = 7.8$ isoliert. Alle gesammelten Fraktionen wurden über mit 4% Stearinsäure desaktivierte A-Kohle gereinigt und anschliessend über P-Cellulose und Ecteola rechromatographiert. Der jetzt reine Stoff zeigt in 4 papierchromatographischen Systemen (10.053) die R_f -Werte der synthetischen Pterin-Carbonsäure. Vergleichende UV-Spektren im Sauren und Alkalischen sind identisch.

Tab. 8 Vergleich der R_f -Werte und der UV-Maxima von $R_E^{1\%AS} = 7.8$ und Pterin-Carbonsäure

		Pterin-Carbonsäure	$R_E^{1\%AS} = 7.8$
System	a	0.11	0.11
	b	0.46	0.46
	c	0.38	0,38
	e	0.08	0.08
UV-Maxima: (λ_{max} , m μ).			
1 n HCl		261.5	260.5
		320	319.5
1 n NaOH		263.5	263.5
		364	362

Dieses Ergebnis ist überraschend, da unter den Versuchsbedingungen Biopterin nicht durch Lichtoxydation in Pterin-Carbonsäure übergehen kann. Vergleichsansätze, ohne Beteiligung von Protein, liefern keine Pterin-Carbonsäure. Biopterin wird also durch Leberprotein in besonderem Maße zu Pterin-Carbonsäure abgebaut. Leider hat sich kein Hinweis finden

lassen, daß dies der Wirkung eines aus nur einem Zellbestandteil der Leber isolierten Enzyms zuzuschreiben ist.

5.7 Beteiligung einzelner Zellfraktionen an der Biopterin- oxydation⁺⁾

Der Frage einer Beteiligung bestimmter Zellfraktionen an dieser Oxydation wurde durch Isolierung von Leberfraktionen mit anschliessender Gewinnung der darin enthaltenen löslichen Enzyme nachgegangen. Lebern mehrerer Ratten wurden in 0.35 m Sucrose-Lösung in einem Potter-Elvehjem homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden durch Zentrifugation bei verschiedenen g-Werten die Zellbestandteile isoliert. Nach dem Verfahren der Butanolextraktion wurden die Enzyme freigesetzt, über Sephadex-Säulen in Tris-Puffer pH 7.0 übergeführt, und - wie in Kapitel 5.4 beschrieben - mit Biopterin inkubiert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle 9 wiedergegeben:

Tab. 9 Inkubation von Leberenzymen mit (8a-¹⁴C)Biopterin in Tris-Puffer 7.0

Zellbestandteil	$R_E^{1\%AS} = 2.1$ (% Ausbeute)	$R_E^{1\%AS} = 7.8$ (% Ausbeute)
Kernfraktion	-	4 - 5
Mitochondrien	-	5
Mikrosomen	-	5
Cytoplasma	-	5 - 6
Leberhomogenat	-	3 - 5

⁺⁾ Herrn Dipl.Chem. K. Sandhoff, Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie, München, danke ich für seine Hilfe bei der Zellfraktionierung und Darstellung der Enzyme aus Rattenlebern.

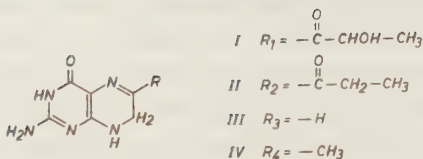
Ein speziell in einem Zellpartikel enthaltendes Enzym, das diese Oxydation bewirkt, konnte somit nicht gefunden werden. Zur Oxydation des Biopterins ist Sauerstoff nötig, denn unter anaeroben Bedingungen (unter Stickstoff, Zusatz von Mercapto-äthanol) unterbleibt die Bildung der Carbonsäure. Versuche mit zugesetztem NAD^+ bzw. NAD^+ plus einem NADH-regenerierenden System verliefen negativ. Unter verschiedensten Bedingungen entsteht beim Inkubieren von Biopterin in Leberhomogenaten nur Pterin-Carbonsäure. Biopterin muß somit in der Rattenleber als sehr stoffwechselstabil angesehen werden. Die Oxydation von Biopterin zu Carbonsäure spielt in vivo wahrscheinlich keine Rolle.

6. Chemie und Biochemie des hydrierten Biopterins

Nach Befunden von S. Kaufmann (15) wirkt Biopterin in seiner hydrierten Form als Coenzym für das Phenylalanin hydroxylierende Enzym. Unter den bisherigen Bedingungen konnte nicht festgestellt werden, daß Biopterin in der Leber auch nur in Spuren aktiviert, also z.B. hydriert, wird. Im folgenden wird auf die Hydrierung von Biopterin eingegangen. Ferner soll gezeigt werden, wie sich hydriertes Biopterin unter ähnlichen Versuchsbedingungen, wie sie in Kapitel 5.4 angewandt wurden, verhält.

6.1 Natürlich vorkommende Vertreter hydrierter Pterine

Die am längsten bekannten Vertreter hydrierter Pterine sind die Di- und Tetrahydro-Folsäure. In der Reihe der natürlich vorkommenden, unkonjugierten Pterine konnte an reinen, dihydrierten Formen bis jetzt das Sepiapterin (I) (30) und das Isosepiapterin (II) (31) in Form gelber Kristalle isoliert werden; beide stellen recht stabile Verbindungen dar. Bei



beiden Stoffen handelt es sich um Abkömmlinge des 7.8-Dihydropterins (III). Spiapterin ist, wie anfangs schon erwähnt, wie Biopterin im Crithidia-Test wuchsstoffaktiv (32). Es kann im System von Kaufman (33) als Cofaktor zur Phenylalanin-Hydroxylierung verwendet werden.

Synthetische 7.8-Dihydropterine, deren Struktur eindeutig gesichert ist, sind das 7.8-Dihydropterin (III) und sein 6-Methylderivat (IV) (34). Über hydriertes Biopterin (34) sind in den letzten Jahren eine Reihe von Vermutungen geäußert worden. Mit Zink/Salzsäure reduziertes Biopterin ist im Falle der Phenylalanin-Hydroxylierung der für das Enzym notwendige Cofaktor.

Bei Untersuchung der wasserlöslichen Augenfarbstoffe von *Drosophila* konnte Viscontini Drosopterine isolieren, in denen er dihydrierte Pterine vermutet. 5.6.7.8-Tetrahydropterine sind bis jetzt in reiner Form nicht dargestellt worden.

6.2 Darstellung hydrierten Biopterins

Zur Reduktion von Biopterin bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Die einfachste Art, Biopterin mit Salzsäure und Zink zu reduzieren, führt nach chromatographischer Auftrennung über P-Cellulose bzw. CM-Cellulose (Serva) zu einer größeren Anzahl undefinierter Folgeprodukte. Bis zu 100 % Ausbeute erzielt man, wie kürzlich W. Gutensohn (36) zeigen konnte, wenn man mit PdO_2 in Wasser hydriert. Dabei wird nur

ein einziges Reduktionsprodukt erhalten. In vorliegender Arbeit wurde Biopterin unter Stickstoff mit NaBH_4 reduziert, in Anlehnung an Arbeiten von Shiota (37). Alle Arbeiten mit hydrierten Pterinen wurden bei maximal dunkelroter Beleuchtung ausgeführt, um Lichtzersetzung zu vermeiden. Shiota war nach dieser Methode bei Reduktion von 6-Hydroxymethylpterin-Phosphat zum Dihydro-Derivat gekommen. Wird Biopterin unter diesen Bedingungen reduziert, so erhält man neben noch nicht umgesetztem Biopterin einen Stoff, der erst nach 15 minütiger Belichtung als blau fluoreszierender Fleck auf dem Papier erscheint mit den R_f -Werten

System	Biopterin	hydriertes Biopterin
a	0.20	0.12
b	0.68	0.47
c	0.54	0.39

Bei der Boranat-Reduktion ist also ein Stoff entstanden, der selbst nicht fluoresziert und erst durch längere Belichtung als für Pterine typisch blau fluoreszierende Verbindung auftritt.

Zur Reindarstellung dieses Stoffes wurde der Reduktionsansatz zunächst zum Schutz des reduzierten Biopterins mit Mercaptoäthanol als Antioxydans versetzt und dann auf eine mit Mercaptoäthanol vorbehandelte P-Cellulosesäule aufgetragen. Elutionsmittel waren 0.2 m Mercaptoäthanol, 1,5%ige Ameisensäure und der Puffer aus 5% Ammonformiat in 5%iger Ameisensäure. Das Ergebnis einer Chromatographie von 600 γ reduziertem (8α - ^{14}C)Biopterin auf P-Cellulose zeigt Abbildung 4. Die Auswertung der Chromatographie ergab 65-70% unverändert zurückgewonnenes Biopterin. An die Biopterinzone I schließt sich ein Schwanz an (II), aus dem drei definierte Stoffe isoliert wurden, und zwar Pterin, ein stark gelb fluoreszierender

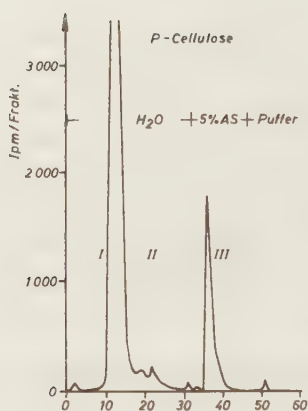


Abb. 4 Chromatographie von 600 γ mit NaBH_4 reduzierten ($8\alpha\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterin auf P-Cellulose (16 x 170 mm).

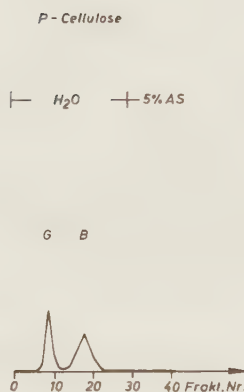


Abb. 5 Rechromatographie des Peaks III auf derselben Säule.

Stoff (G) und Biopterin (B). Im Bereich III konnten Biopterin und G im Verhältnis 1:1 erkannt werden. Bei Rechromatographie dieses Gipfels III (Abb. 5) wird G vor Biopterin mit Wasser von der Säule eluiert. Beide Verbindungen sind also durch Zersetzung des Stoffes entstanden, der bei sofortiger papierchromatographischer Auswertung des Reduktionsansatzes erst nach Belichtung (Oxydation) als blau fluoreszierender Fleck auftaucht.

System	a	b	c	e
Biopterin	0.20	0.68	0.54	0.23
Pterin	0.20	0.54	0.40	0.23
G	0.37	0.21	0.18	0.40

Aus dem Reduktionsansatz, der über P-Cellulose chromatographiert wurde, konnten zwei neue Stoffe isoliert werden, die als Zersetzungsprodukte des hydrierten Biopterins auftreten. Die Bildung von Pterin ist verständlich. Nach Arbeiten von Wood (34) entsteht bei Rückoxydation von 6-Alkyl- bzw. 6-Polyhydroxyalkyl-5.6.7.8-tetrahydro-pterinen Pterin als Folge einer Rearomatisierung von Ring B des Pterins.

Stoff G, der in gelben Kristallen erhalten werden konnte, zeigt ein UV-Spektrum, das im Sauren und Alkalischen (Abb. 6) dem des Sepiapterins sehr ähnlich ist, aber mit ihm nicht identisch ist.

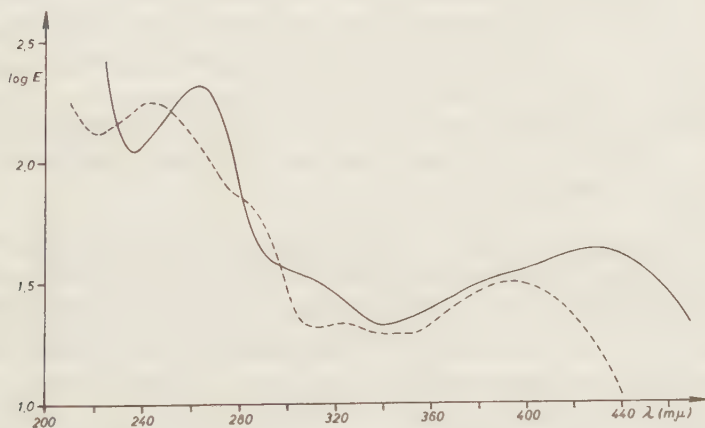


Abb. 6 Spektrum von G in 0.1 n HCl (---) und 0.1 n NaOH (—)

Beim Kochen in 0.7 n Salzsäure während 30 Minuten ändert sich das Spektrum, wobei das Spektrum für Polyhydroxyalkylpterine erscheint (Abbildung 7).

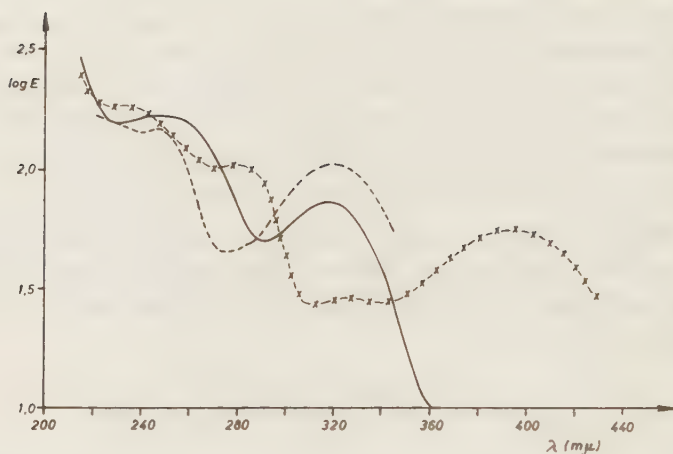


Abb. 7 Spektrum von G in 0.7 n HCl (-x-x-) vor und nach
(—) Kochen, Spektrum von Biopterin in 0.1 n
HCl (----)

G ist eine recht stabile Verbindung. Im Crithidia-Test⁺) ist sie genauso wuchsstoffaktiv wie Biopterin. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß es sich um 7.8 Dihydrobiopterin handelt. Bei der Reduktion von Biopterin mit NaBH₄ unter Stickstoff bildet sich ein Stoff, der nicht fluoresziert. Er ist sehr instabil und oxydiert sich beim Versuch, ihn über P-Cellulose zu reinigen, zu Biopterin, Pterin und wahrscheinlich 7.8-Dihydrobiopterin. Diese Tatsachen legen den Schluß nahe, daß das sehr instabile 5.6.7.8-Tetrahydrobiopterin entstanden ist. In den folgenden Versuchen wird deshalb der Reduktionsansatz meistens nach Neutralisation zur Stabilisierung mit 30 mg Mercaptoäthanol pro Enzymansatz versetzt und

⁺) Fräulein I. Wieber danke ich für die sorgfältige Durchführung dieses Tests.

direkt dem Inkubationsmedium zugesetzt. Die Ausbeute an Tetrahydrobiopterin beträgt 30-35%.

7. Stoffwechselverhalten von Tetrahydrobiopterin

in vitro

7.1 Isolierung eines chromatographischen Gipfels S

Tetrahydrobiopterin hat sich, wie in Kapitel 6.2 gezeigt wurde, als sehr instabiler Stoff herausgestellt. Zur Stabilisierung der Tetrahydrobiopterinlösungen wurden dem Reduktionsansatz geringe Mengen Mercaptoäthanol zugesetzt. In kommenden Versuchen wurden als in vitro-Systeme, wie schon in 5.4, Leberhomogenate verwendet. Pro Ansatz wurden 1.5 μ Mol reduziertes Biopterin mit dem Homogenat aus 1 g Leber in 6 ml Puffer drei Stunden lang im Schüttelinkubator bei 37°C gehalten. Bei anaerober Inkubation im schwachen Stickstoffstrom lieferten die Versuche, auch bei Variierung des Puffers und des pH zwischen 3.1 und 9.3 nur Pterin und 7.8-Dihydrobiopterin als Zersetzungsprodukte der Tetrahydroform.

Wesentlich anders gestalteten sich die gleichen Experimente bei aerober Inkubation. Die hitzedenaturierten Ansätze wurden abzentrifugiert, der Überstand zunächst über Ecteola, dann über P-Cellulose chromatographiert. Bei Chromatographie über Ecteola traten keine stärker sauren Metaboliten außer der Pterin-Carbonsäure auf, falls ohne Mercaptoäthanol im Ansatz gearbeitet wurde. Auf P-Cellulose setzte sich jedoch eine Zone S ab, die kurz hinter der Front und weit vor dem Biopterin eluiert wurde. Die Auswertung der Chromatographie beschränkte sich darauf, 1/36 der jeweils gesammelten Fraktionen auf ihre Radioaktivität zu untersuchen (Abbildung 8).

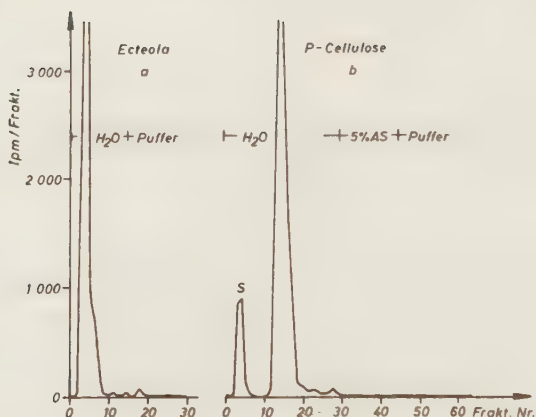
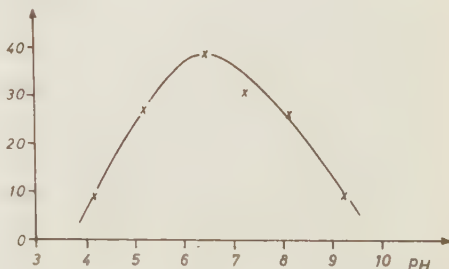


Abb. 8 Auswertung eines Inkubationsansatzes durch Chromatographie über Ecteola (16 x 170 mm) (a) und P-Cellulose (16 x 170 mm) (b), 18 ml-Fraktionen.

Hitzedenaturiertes Leberprotein ergab keinen Umsatz. Die pH-abhängige Bildung der Substanzzone S ist, bezogen auf 30% Tetrahydrobiopterin im Biopterin-Reduktionsansatz in Tabelle 10 und Abbildung 9 zusammengestellt. Substanz S wurde in

pH	Puffer	% Umsatz	% Umsatz
4.2	C/P	8.8	
5.3	C/P	26.4	
6.5	C/P	38.2	
7.3	T	30	
8.2	T	27	
9.3	T	9	



Tab. 10 und Abb. 9 Abhängigkeit der Ausbeute an S vom pH des Inkubationsmediums.

größter Ausbeute bei pH 6.5 erhalten. Es ergab sich ein Umsatz von ungefähr 38% des im Reduktionsansatz vorhandenen Tetrahydrobiopterins.

In den kommenden Experimenten wurde zu klären versucht, welche Zellpartikel für diesen Umsatz verantwortlich sind. Rattenlebern wurden in 0.35 m Sucroselösung homogenisiert und wie in Kapitel 5.7 fraktioniert zentrifugiert. Der Überstand aus der Microsomenengewinnung wurde mit Sephadex G-25 konzentriert, das erhaltene Konzentrat direkt für die Inkubationsansätze verwendet. Die gewaschenen, rezentrifugierten Zellpartikel wurden in dem zu inkubierenden Puffer homogenisiert und so für die Ansätze bereitgestellt. Das Ergebnis gibt Tabelle 11.

Tab. 11 Beteiligung der Zellbestandteile am Umsatz zu Substanz S

Kernfraktion	30% Umsatz
Mitochondrien	40%
Microsomen	24%
Cytoplasma	6%

Bedenkt man, daß beim Homogenisieren in 0.35 m Sucroselösung nicht alle Zellen aufgeschlossen wurden, so wird die hohe Umsatzrate in der Kernfraktion verständlich. Die Enzyme, die Tetrahydrobiopterin umwandeln, sind nach diesem Ergebnis in den Mitochondrien lokalisiert.

Versuche, mit Hilfe der Butanolextraktion ein Enzym aus den Mitochondrien zu isolieren, waren wenig erfolgreich. Während Mitochondrien aus einer Rattenleber bis zu 40% Tetrahydrobiopterin umsetzen, lag die Ausbeute an S bei Verwendung eines Enzymkonzentrates aus den Mitochondrien von sechs Rattenlebern zwischen 6 und 20%.

Der Umbau von Tetrahydrobiopterin zu S verläuft zeitabhängig. In den ersten 140 Minuten der Inkubation steigt die Ausbeute an S linear an und erreicht hierbei 20%. Der Wert bei drei Stunden liegt, wie schon gezeigt, bei 40%. Längere Inkubationszeiten bringen keinen erhöhten Umsatz.

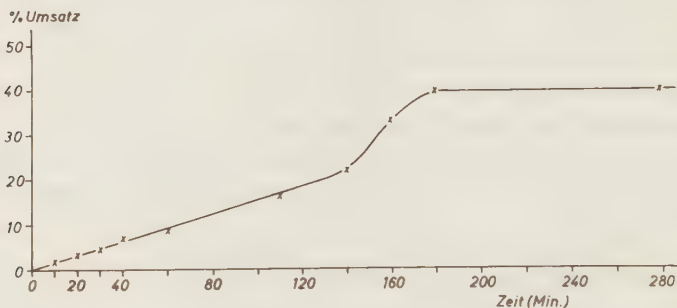


Abb. 10 Abhängigkeit der Ausbeute an S von der Zeit

Die Umsatzrate zu der Substanzzone S läßt sich jedoch, wie Tabelle 12 zeigt, beeinflussen. Wird dem Mitochondrienhomogenat NADP^+ oder löslicher, mit Hitze nicht fällbarer Leberanteil zugesetzt, so beträgt die Ausbeute an S 25%. Wesentlich erhöht ist der Wert, falls dem Inkubationsansatz p-Chlor-mercuribenzoat (PCMB) in einer Konzentration von 10^{-3} M zugesetzt wird. KCN ist auf die Entstehung von S in einer Konzentration von 2.5×10^{-3} ohne Einfluß.

Tab. 12 Abhängigkeit der Ausbeute an S von Zusätzen zum Inkubationsmedium.

Zusätze	% Ausbeute an S
Standardansatz, mit Mercaptoäthanol(-SH), 30 mg	40
NADP [†] , 10 mg	25
mit Hitze nicht denaturierbare Anteile von 1.5 g Rattenleber	30
KCN, $2.5 \times 10^{-3}M$, ohne -SH	33
NAD [†] , 11 mg	37
Phe, 82 mg	40
ohne -SH	40
PCMB, $10^{-3}M$, ohne -SH	66

7.2 Untersuchung von S

Die bisherigen Befunde über die Substanzzone S ergeben folgendes Bild: S entsteht nur bei aerober Inkubation von Tetrahydrobiopterin, nicht von Biopterin. Blindversuche, die an Stelle von nativem denaturiertes Leberprotein verwenden, verlaufen negativ. S entsteht mit einem deutlichen pH-Optimum von 6.5. Zusatz von mit Hitze nicht denaturierbaren Leberanteilen führen zu einer Verminderung der Ausbeute. Den optimalen Umsatz zu S ergeben die Mitochondrien. Das Enzym läßt sich aus den Mitochondrien nur schwer isolieren. S verhält sich auf einem schwachen Anionenaustauscher wie ein Neutralstoff oder eine Base, auf einem Kationenaustauscher wie ein Neutralstoff oder eine Säure. Zu seiner Reinigung verwendet man die Chromatographie an Dowex 1 X 8. Auf diesem starken Anionenaustauscher konnte aus S in der Hauptsache ein Stoff mit schwach sauren Eigenschaften isoliert werden. Beim Versuch, diesen Stoff zu oxydieren, konnte keine Pterin-Carbon-

säure isoliert werden. Es handelt sich also um kein einfaches 6-substituiertes Polyhydroxyalkylpterin. Das UV-Spektrum zeigt, daß in Stellung 6 ein Substituent erster Ordnung sitzen muß. Beim Kochen mit 0.5 n Salzsäure während 30 Minuten ändert sich das Spektrum dieser Verbindung nicht, sie ist also sehr stabil. Nach diesen Befunden kann die Substanz ein Pteridin sein, das in Stellung 6 eine Hydroxylgruppe trägt. Beim Vergleich mit den in der Literatur veröffentlichten Spektren schien es wahrscheinlich, daß S mit 6-Hydroxylumazin identisch ist (38).

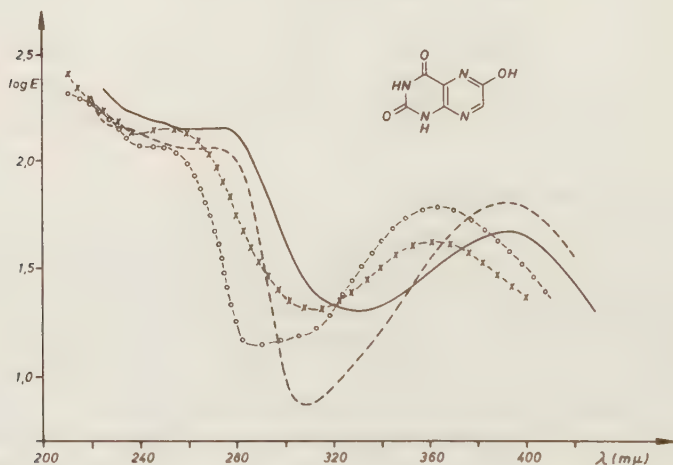


Abb. 11 Vergleich der Spektren von S in 0.1 n HCl (-x-x-) und in 0.1 n NaOH (—) mit jenen authentischen 6-Hydroxylumazins im Sauren (o-o-o) und Alkalischen (----).

Synthetisches 6-Hydroxylumazin zeigt in der Tat auf Dowex 1 X 8 dasselbe Säulenverhalten wie S. Papierchromatographisch läuft S allein und im Mischfleck mit 6 Hydroxylumazin in 4 Systemen identisch.

System	S	6-Hydroxylumazin
a	0.31	0.31
b	0.50	0.50
c	0.42	0.41
e	0.14	0.14

S ist somit mit 6-Hydroxylumazin identisch.

7.3 Verhalten von 6-Hydroxylumazin im enzymatischen Ansatz

Wird Tetrahydrobiopterin zusammen mit nicht reduziertem Biopterin und Borsäure, die aus dem Reduktionsansatz des Biopterins stammt, in das in 7.1 beschriebene biologische System eingesetzt, so entsteht 6-Hydroxylumazin. Es zeigen sich außer Spuren Pterin-Carbonsäure keine weiteren sauren Folgeprodukte. Letztere dürfte nach den in Abschnitt 5.4 beschriebenen Versuchen aus Biopterin entstanden sein. Wird jedoch in einem erneuten Ansatz das reine 6-Hydroxylumazin eingesetzt, so erfolgt nach dreistündiger aerober Inkubation bei pH 6.5 bei Verwendung von Mitochondrienpräparaten aus Rattenlebern ein 95%iger Umsatz zu einer schwach sauren Substanz S'. Diese Substanz kann von Ecteola mit 0.1%iger Ameisensäure eluiert werden. Ihr UV-Spektrum legt es nahe, daß die neue Substanz S' ein weiteres Oxydationsprodukt des 6-Hydroxylumazins ist.

1959 fanden F. Korte und Mitarb. (39), daß Xanthopterin in Leberhomogenaten durch Xanthinoxydase in Leucopterin umgewandelt wird. 1963 beschrieb W.S. Mc Nutt ein Bakterium, das Xanthopterin zunächst in 6-Hydroxylumazin umwandelt und dann zu 6.7-Dihydroxylumazin weiter oxydiert.

Diese Gründe machten es wahrscheinlich, daß in der neuen Verbindung 6.7-Dihydroxylumazin vorliegt. In der Tat erwies er sich in 4 papierchromatographischen Systemen wie auch im

UV-Spektrum (Abb. 12) als identisch mit dem Umsetzungsprodukt des 6-Hydroxylumazins, dem 6.7-Dihydroxylumazin.

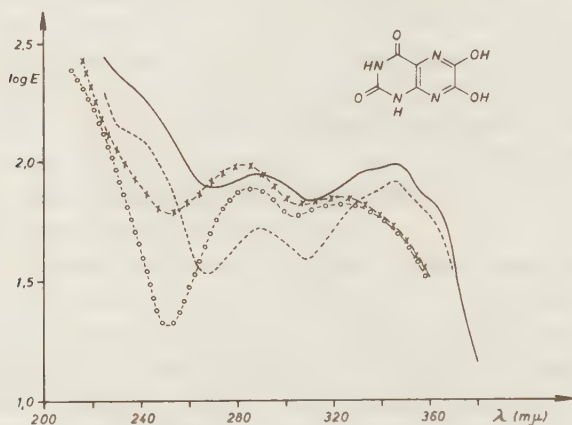


Abb. 12 Vergleich der UV-Spektren von S' in 0.1 n HCl (-x-x-) und in 0.1 n NaOH (—) mit jenen authentischen 6.7-Dihydroxylumazins im Sauren (o-o-o) und Alkalischen (----).

		S'	6.7-Dihydroxylumazin
System	a	0.042	0.042
	b	0.32	0.32
	c	0.29	0.29
	e	0.07	0.07

Die Erklärung dafür, daß bei den Untersuchungen in Kapitel 7.1 kein 6.7-Dihydroxylumazin gefunden wurde, geben die Befunde von A. Roush und Earl R. Norris (48)⁺). Bei Untersuchung

⁺) Herrn Dipl.Chem. W. Gutensohn danke ich für die Durchsicht der Literatur.

der Xanthinoxydase fanden diese Autoren, daß Borat ein kompetitiver Hemmstoff ist. Das bei allen Versuchen mit Tetrahydrobiopterin vorhandene, aus der Reduktionslösung des Biopterins stammende Borat bewirkte, daß das 6-Hydroxylumazin durch die Xanthinoxydase nicht weiter oxydiert wurde. Erst als das 6-Hydroxylumazin in reiner Form in das gleiche System eingesetzt wurde, kam es zur weiteren Umwandlung zu 6.7-Dihydroxylumazin.

8. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Biopterinstoffwechsels bei der Ratte. H. Rembold untersuchte den Biopterin-Stoffwechsel an der Taufliege *Drosophila melanogaster* (28) und an der Honigbiene (21). *Drosophila*-Larven bekamen ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterin verfüttert. Die voll entwickelten Imagines wurden auf radioaktive Folgeprodukte untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß zwischen 40 und 60% der Radioaktivität im Biopterin bzw. dessen Lichtzersetzungsprodukt, der Pterin-Carbonsäure, geblieben waren, während 10% der Radioaktivität als Pterin (= 2-Amino-4-hydroxy-pteridin) vorlag. Bekommen Ratten (28) ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterin intraperitoneal injiziert, so scheiden sie (3.1) den größten Teil des Biopterins wieder aus. Im Harn finden sich wiederum 60 bis 70% der Radioaktivität im Biopterin, 16% im Pterin. Biopterin wird von der Ratte täglich mit dem Normalharn ausgeschieden. Auch bei biopterinfreier Diät (16) scheidet sie weiterhin Biopterin aus. Sie scheint es somit selbst zu synthetisieren. Verfüttertes Biopterin wird von der Ratte bis zu 90% der gereichten Dosis resorbiert und nicht wieder aus-

geschieden. Die Substanz scheint somit für die Ratte von Bedeutung zu sein. Erstaunlich ist das verschiedenartige Resorptionsverhalten. Wird Biopterin i.p. injiziert, so werden innerhalb von 48 Stunden 90% ausgeschieden, bei oraler Applikation dagegen nur 9%. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß Biopterin im Organismus umgebaut werden muß, um seine eigentliche Wirkung zu entfalten.

Biopterin ist im Weiselfuttersaft vorhanden. Dem Nährmedium von Crithidia zugesetzt, wirkt es als Wachstoffsstoff. In der Leber findet man pro Gramm 1 γ Biopterin (4.3). Die Wachstoffsstoffaktivität, welche Leberextrakte im Crithidia-Test (28) entfalten, entspricht aber 30 γ pro Leber. Es sind also nur 17% der Crithidia-Aktivität im Leberextrakt auf Biopterin zurückzuführen, der Hauptteil liegt in einer anderen wirksamen Form vor.

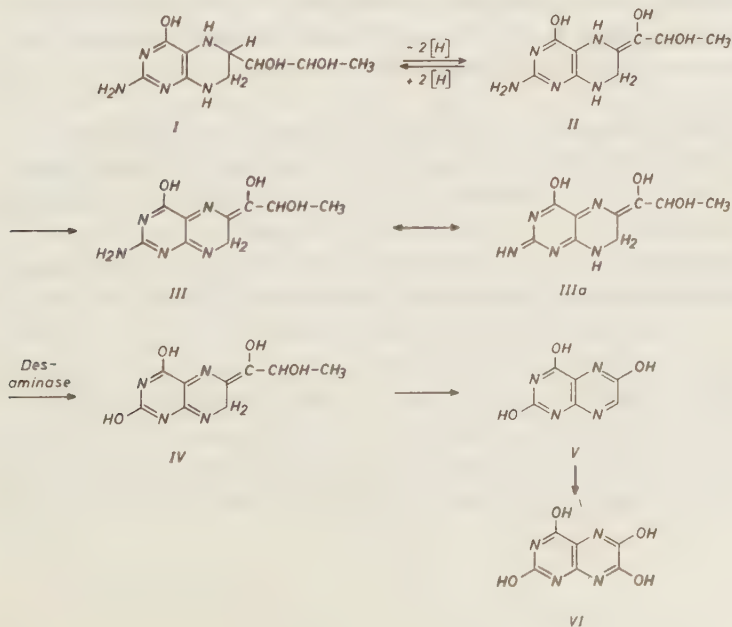
In Lebern von mit (8a-¹⁴C)Biopterin behandelten Ratten gehören 10% der Aktivität dem Biopterin, 63% einem Stoff an, der entweder basischer oder neutraler als Biopterin und sehr instabil ist. Aus Rattenleber konnten keine Biopterin-abkömmlinge in größerer Menge isoliert werden, die stärker saure Funktionen besitzen, wie dies z.B. für das von Ziegler (14) diskutierte Ribosid-Phosphat zu fordern wäre.

Alle Befunde sprechen für einen Umbau des Biopterins in eine aktivierte Form. Leberhomogenate können Biopterin nicht aktivieren (5.4). Außer dem Abbauprodukt Pterin-Carbonsäure konnte kein Biopterin-Metabolit gefunden werden. Der Befund, daß Biopterin nach Injektion zum größten Teil sofort wieder ausgeschieden wird, spricht ebenfalls dafür, daß es weder im Blutkreislauf noch in der Leber aktiviert werden kann.

Worin besteht die Aktivierung, die Biopterin benötigt, um im Stoffwechsel wirken zu können? Zur Beantwortung dieser Frage gibt S. Kaufman (33) als erster einen Hinweis. In

dem von ihm untersuchten System der Phenylalaninhydroxylierung wirkt mit Zink/Salzsäure reduziertes Biopterin als Cofaktor. Biopterin muß also hydriert werden, um eine aktive Form darzustellen. Wird Biopterin durch Boranatreduktion in die Tetrahydroform überführt, so erhält man eine sehr instabile Verbindung (6.2), die leicht zu Pterin, Dihydrobiopterin und Biopterin oxydiert wird. Bei Stoffwechseluntersuchungen an Drosophila, wie auch bei Untersuchung des Harnes von Ratten, konnte Pterin festgestellt werden, also gerade jener Stoff, der aus Tetrahydrobiopterin entsteht (6.2).

Biopterin wird im Leberhomogenat nur in kleiner Menge zur Pterin-Carbonsäure abgebaut (5.4). Tetrahydrobiopterin jedoch ergibt in Ausbeuten von 40% nach dreistündiger aerober Inkubation eines Leber-Mitochondrien-Homogenates bei Gegenwart von Borat bei pH 6.5 6-Hydroxylumazin (7.2), bzw. ohne Borat 6.7-Dihydroxylumazin. Die Bildung dieser Stoffe ist zu erklären, wenn angenommen wird, daß die 6-Stellung des Tetrahydrobiopterins auf folgendem Wege aktiviert wird:



Würde die Seitenkette auf der Stufe II oder kurz danach eliminiert, so entstünde Xanthopterin. Dieser Stoff wurde im Ansatz nicht gefunden, vielmehr entsteht 6-Hydroxylumazin (V). Dies läßt sich erklären, wenn II zu III weiteroxydiert wird. In dieser Verbindung ist die 2-Aminogruppe derart aktiviert, daß sie eliminiert werden kann. Möglicherweise ist an diesem Schritt eine Desaminase beteiligt, wie dies aus der Pyrimidin- und Purin-Biochemie (43), neuerdings auch aus der Pterin-Biochemie (40,44) bekannt ist. Durch Oxydation von IV erhielt man das 6-Hydroxylumazin, das von Xanthinoxydase zum 6.7-Dihydroxylumazin weiteroxydiert wird.

Dieses Schema enthält noch viele Unsicherheiten, kann aber als Ausgangsbasis für weitere Forschungen auf diesem Gebiet verwendet werden. In diesem Schema fände auch sehr gut die Tatsache Platz, daß hydriertes Biopterin im System von S. Kaufman einen zur Hydroxylierung notwendigen Cofaktor darstellen kann. Die Hydroxylierung von Substanzen kann im Rahmen der Umwandlung von Tetrahydro- zu Dihydrobiopterin, also zwischen I und II stattfinden. Wird II wieder reduziert, so ist man wieder beim Tetrahydrobiopterin.

Dieses Schema kann ferner dafür eine Erklärung geben, warum 6-Hydroxylumazin im Ansatz 7.2 nur sehr langsam entsteht. Erst wenn die Substrate bzw. die reduzierten Pyridin- oder Flavin-Nukleotide, die sich im löslichen, mit Hitze nicht denaturierbaren Leberanteil befinden, verbraucht sind, kommt es zur Bildung der Stoffe III bis VI.

9. Zusammenfassung

Durch chromatographische Trennung an phosphorylierter Cellulose wurden synthetisches Biopterin und 7-Biopterin erstmals in reiner Form erhalten. Im Gegensatz zu Biopterin ist 7-Biopterin im Wachstumstest bei *Crithidia fasciculata* inaktiv. Die Ausbeute ist bei der Biopterinsynthese stark von den Reaktionsbedingungen abhängig und liefert unter optimalen Bedingungen 7% Biopterin und 26% 7-Biopterin, bezogen auf eingesetztes 2.4.5-Triamino-6-hydroxypyrimidin. Die Radiosynthese der beiden Pterine, ausgehend von $K^{14}CN$, wird beschrieben.

Das Resorptionsverhalten von Biopterin hängt bei der Ratte stark von der Art der Applikation ab. Wird Biopterin intraperitoneal oder subcutan injiziert, so scheiden die Tiere innerhalb kurzer Zeit bis zu 90% der gegebenen Dosis wieder aus. Erhalten die Tiere Biopterin verfüttert, so kann innerhalb der ersten 48 Stunden nur mehr 9% des applizierten Materials im Harn nachgewiesen werden. Bei Untersuchung der Ratte zwei bis drei Tage nach oraler Aufnahme größerer Mengen ($8\alpha\text{-}^{14}C$)Biopterins findet sich nur ein kleiner Teil der Radioaktivität wieder, hauptsächlich in der Leber und der Nebenniere; das Serum enthält ebenfalls noch beträchtliche Mengen radioaktiven Materials.

Normale Leber enthält Biopterin. Bei Aufarbeitung von 250 g Rattenlebern konnten 250 γ Biopterin isoliert werden. "Radioaktive" Lebern enthalten nur 10% der Radioaktivität als Biopterin, 63% verbergen sich hinter einem Stoff, der entweder stark basische oder neutrale Eigenschaften besitzt. Dieser Stoff ist sehr instabil. Bei Reinigung über mit 4% Stearinsäure desaktivierte A-Kohle und Desorption mit einem Gemisch aus konz. Phenollösung/konz.wässrigem Ammoniak zer-

fällt er in mehrere uneinheitliche Produkte. An bisher bekannten Pterinen konnte aus der Leber nur Biopterin isoliert werden. Die Pterine sind in der Leber nicht in Strukturen ein- bzw. fest angebaut. Bei in vitro-Versuchen, durchgeführt mit Rattenleberhomogenaten, stellt sich Biopterin als sehr stoffwechselstabil heraus. Nur ein ganz kleiner Teil wird proteinspezifisch unter aeroben Bedingungen zur Pterin-Carbonsäure-(6) oxydiert. Der Rest des Biopterins bleibt unverändert. Der Grundkörper Biopterin kann von der Leber nicht aktiviert werden.

Biopterin kann mit Natriumborant unter Stickstoff zu 30-35% zum sehr instabilen Tetrahydrobiopterin reduziert werden. Versuche, dieses unter Zugabe von Mercaptoäthanol auf P-Cellulose zu reinigen, führten zu drei Substanzen, die als Zersetzungsprodukte des Tetrahydrobiopterins angesehen werden müssen: zu Pterin, Biopterin und einer sehr stabilen, gelb kristallisierenden Verbindung. Vergleiche mit Sepiapterin und seine biologische Aktivität im Crithidia-Test machen es wahrscheinlich, daß es sich bei diesem Stoff um 7.8-Dihydrobiopterin handelt. Nach Kochen in 0.7 n Salzsäure während 30 Minuten zeigt er das saure Spektrum von Biopterin.

Tetrahydrobiopterin wird in Gegenwart von Borsäure durch Lebermitochondrien mit einem pH-Optimum von 6.5 in 38%iger Ausbeute aerob zu 6-Hydroxylumazin umgebaut. Dieser Abbau wird in Gegenwart von p-Chlor-mercuribenzoat auf 66% erhöht, bei Zugabe von NADP auf 25% erniedrigt. Mitochondrienpräparate aus Rattenlebern können reines 6-Hydroxylumazin in einer Ausbeute von 95% bei pH 6.5 unter aeroben Inkubationsbedingungen zu 6.7-Dihydroxylumazin weiteroxydieren. Mögliche biochemische Zusammenhänge, die sich aus diesen Ergebnissen abzeichnen, werden diskutiert.

10. Experimenteller Teil

10.01 Verwendete Ionenaustauscher

Vorliegende Arbeit war nur möglich durch Verwendung der für die einzelnen Probleme spezifisch geeigneten Ionenaustauscher:

Dowex 1X8, von der Dow Chemical Company hergestellt, ist ein starker Anionenaustauscher, 200-400 mesh, Gegenion Cl' .

Ecteola-Cellulose (Serva). Sie ist ein schwacher Anionenaustauscher auf Cellulosebasis und wird hergestellt aus Epichlorhydrin, Triäthanolamin und Natrium-Cellulose. Ihre Konstitution ist nicht eindeutig bekannt.

CM-Cellulose (Serva), ein Kationenaustauscher mit der sauren Gruppe $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

P-Cellulose (Serva), ein schwächerer Kationenaustauscher als CM-Cellulose mit der funktionellen Gruppe $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$.

Für das Spezialproblem der Konzentrierung bzw. Anreicherung von Enzymen wurde verwendet:

Sephadex G-25, Coarse (Pharmacia, Uppsala).

10.021 Präparation der Cellulose-Austauschersäulen

Die für die verwendeten Säulen benötigte Menge Austauscher-material wird in Wasser suspendiert. Nach Quellen und Absetzen des Materials im Becherglas wird dekantiert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis der größte Teil der feinen Bestandteile entfernt ist. Anschliessend füllt man den dünnen, wässrigen Brei in Glassäulen, die unten mit einem Wattebausch und einem Hahn abgeschlossen sind. Nachdem sich der Austauscher homogen gepackt hat, wird die Säule mit dem sechsfachen Volumen Puffer (5% Ammonformiat in 5%iger Ameisensäure), anschliessend mit der gleichen Menge 5%iger Ameisen-

säure durchgewaschen. Dann wird die Säule solange mit Wasser gewaschen, bis sie neutral ist.

Zur Erzielung einer einwandfreien Trennung ist es wichtig, die Oberfläche der Säule homogen festzudrücken, ehe die Substanz aufgetragen wird. Zum Regenerieren der Säule wäscht man die Füllung mit dem angegebenen Formiatpuffer so lange, bis die Hauptmenge der fluoreszierenden Verbindungen herausgewaschen ist, anschliessend mit der vorher angegebenen Menge 5%iger Ameisensäure und Wasser. Selbst bei 30-50-maliger Benutzung liefert die Säule noch gute Trennergebnisse, wenn auch das spezifische Retentionsvolumen für ein und dieselbe Verbindung langsam abnimmt. Wird die Durchflußgeschwindigkeit zu langsam, so ist es nötig, das Säulenmaterial kurz in einem Becherglas mit Wasser aufzuschlämmen, um somit die bei der Benutzung entstandenen feinsten Austauscherteilchen zu entfernen. Zur Vereinfachung der Chromatographie wird die Säule über einen dünnen Schlauch an ein Gefäß gehängt, das die entsprechende Elutionslösung enthält.

10.022 Präparation der Dowex-Säule

Bei der Präparation dieser Säule wurde streng nach einer Vorschrift gearbeitet, die L. Buschmann in seiner Dissertation ausgearbeitet hat (29).

10.03 Darstellung und Reinigung des Biopterins

2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin wurde nach C.K. Cain, M.F. Mallette und E.C. Taylor (25) hergestellt.

5-Desoxy-L-arabinose: Ausgehend von 100 g L-Rhamnose wurde nach Vorschrift von E.L. Patterson und Mitarb. (1) 7.5 g (9.1% d.Th.) 5-Desoxy-L-arabinose als Syrup erhalten. Die quantitative Zuckerbestimmung wurde auf colorimetrischem Wege (45) durchgeführt.

Rohbiopterin-Darstellung, Standardbedingung: 119,6 mg 96%iges Hydrazinhydrat (2.3 mMol) werden in einem 50 ml Rundkolben mit 110 mg 5-Desoxy-L-arabinose (0.82 mMol) in 0.5 ml Wasser auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 15 Minuten gibt man zu der Lösung 3.5 ml Wasser und 1.0 ml Eisessig (oder ein entsprechendes Reaktionsmedium nach Tab. 3) und erhitzt mit 91.5 mg 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidinsulfat (0.38 mMol) weitere 25 Minuten auf dem Wasserbad. Die Lösung kann in gewissen Grenzen direkt auf die Säule aufgetragen werden. (Zur Ausbeutebestimmung wurden 20% der auf 30 ml verdünnten Reaktionslösung auf einer P-Cellulosesäule chromatographiert.) Das nach 10 Stdn. im Eisschrank ausgefallene Rohprodukt macht 50-65% d.Th. aus. Es enthält etwa 20% Biopterin (7% d.Th.) und 23.7 mg (26% d.Th.) 7-Biopterin.

Chromatographie von Rohbiopterin

100 mg Rohbiopterin werden in 150 ml Wasser aufgeköcht, die Lösung wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur filtriert. Das in dieser Flüssigkeitsmenge vollständig gelöste Biopterin wird mit einer Pipette auf eine P-Cellulosesäule von 130 ml Säulenvolumen aufgetragen. Nach Einziehen der Lösung wird mit mehreren Portionen warmem Wasser nachgespült und dann die Säule mit einem Vorratsgefäß verbunden. Entwickelt wird mit destilliertem Wasser. Beim Anleuchten mit der UV-Lampe ist die Pterinzone als blau fluoreszierende Bande am Säulenkopf zu erkennen. Man reguliert auf 8-10 Tropfen pro Minute ein und fängt die ausfließende Lösung in 10 oder 25 ml-Fractionen auf. Die Chromatographie wird im Dämmerlicht durchgeführt, um Lichtzersetzung zu vermeiden. Zur Auswertung werden die Fractionen bei 272 m μ vermessen und bei einer optischen Dichte über 1.5 entsprechend verdünnt. Vom Beginn der ersten, stark blau fluoreszierenden Haupt-

zone an wird außerdem bei 252 m μ gemessen und der Quotient E_{272}/E_{252} bestimmt. Die Biopterinzone mit einem Quotienten von > 1.70 und die Zone des 7-Biopterins mit einem solchen zwischen 1.70 und 1.45 wird gesammelt und im Vakuum eingengt. Bei der Rechromatographie werden die jeweiligen Fraktionen mit konstantem Quotienten isoliert, die Übergangszonen nochmals rechromatographiert. Die Lösungen der reinen Isomeren werden im Rotationsverdampfer auf kleines Volumen eingengt und 24 Stunden bei 0°C gehalten. Der erhaltene Niederschlag wird abzentrifugiert und noch dreimal aus je drei ml Wasser umkristallisiert. Die Kristalle werden mit wenig Methanol gewaschen und bei 110°C im Vak. getrocknet. Ausbeute 4 mg Biopterin und 23 mg 7-Biopterin. Nach Permanganatoxydation (29) wurde reine Pterin-Carbonsäure-(6) und -(7) erhalten.

10.04 Synthese von (8a-¹⁴C)Biopterin und -7-Biopterin aus K¹⁴CN

(4-¹⁴C)2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat: In einen 100 ml Rundkolben werden 203.5 mg Chloressigsäure (2.15 mMol) eingewogen, 300 mg wasserfreies K₂CO₃ zugegeben und anschliessend langsam 1 ml Wasser. Nach beendeter CO₂-Entwicklung fügt man 130.2 mg K¹⁴CN (2 mMol, spez. Aktivität 1 mC/mMol) zu und erhitzt eine Stunde lang auf dem Wasserbad. Nach Abziehen des Wassers im Rotationsverdampfer wird das Kaliumsalz der Cyanessigsäure zwei Tage lang über CaCl₂ getrocknet. Man verestert dann in vier ml abs. Methanol mit 0.8 ml Dimethylsulfat (8.5 mMol), indem man eine Stunde unter Rückfluß kocht, gibt 292.8 mg Guanidinnitrat (2.4 mMol), 4 ml abs. Methanol und tropfenweise eine Lösung von 0.3 g Natrium in 3 ml abs. Methanol zu, erhitzt zwei Stunden auf dem Wasserbad und versetzt dann mit 5 ml Wasser, stellt mit konz. Salzsäure einen pH von 4 ein und destilliert das Metha-

nol vollständig ab. Man gibt anschliessend 1 ml Wasser zu, bei 90°C eine konz. Natriumnitrit-Lösung bis zu dessen Überschuß, hält noch weitere fünf Minuten bei dieser Temperatur und pipettiert dann den rosaroten Niederschlag von (4-¹⁴C)-2.4-Diamino-6-hydroxy-5-nitroso-pyrimidin in ein Zentrifugenglas. Den Niederschlag wäscht man dreimal mit je drei ml Wasser aus, löst die Nitrosoverbindung in drei ml 10%iger Natronlauge und versetzt so lange bei 95°C mit festem Dithionit, bis die anfangs dunkelrote Lösung hellgelb wird. Es wird weitere fünf Minuten bei 95°C gehalten, dann wird konz. Salzsäure zugetropft und eine kleine Spatelspitze A-Kohle zur Adsorption des entstandenen Schwefels zugegeben. Die Lösung wird noch heiß abgesaugt, mit 12 Tropfen konz. Schwefelsäure und zwei ml Methanol versetzt. Man läßt 12 Stunden im Eisschrank stehen und erhält 50.1 mg (11% d.Th., bezogen auf KCN) des radioaktiven Pyrimidins als farblose Nadeln, die abgesaugt und mit Methanol gewaschen werden.

Radiosynthese des Biopterins

In einem 50 ml Rundkolben werden 66.1 mg 96%iges Hydrazinhydrat (1.27 mMol) eingewogen und 63 mg 5-Desoxy-L-arabinose (0.47 mMol) in 0.5 ml Wasser zugegeben, wobei sich die Lösung etwas erwärmt. Man hält auf dem Wasserbad für 15 Minuten bei 95°C, fügt dann 1.9 ml Wasser, 0.6 ml Eisessig und 50.1 mg (4-¹⁴C)2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat (0.21 mMol) zu, erhitzt weitere 25 Minuten. Bereits nach 15 Minuten färbt sich die Lösung dunkelgelb. Nach beendeter Reaktion verdünnt man mit Wasser auf 30 ml und trägt diese Lösung auf eine P-Cellulosesäule auf. Nach zweimaliger Rechromatographie auf derselben Säule erhält man mit der beschriebenen Auswertung 2.4 mg reines (8a-¹⁴C)Biopterin (0.5%, bezogen auf eingesetztes KCN) und 7.7 mg (8a-¹⁴C)7-Biopterin (1.6% d.Th.).

10.05 Spezielles

- 10.051 Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers PMQ 2 (Zeiss) durchgeführt, die Aufnahme der UV-Spektren mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer DK 2 von Beckman.
- 10.052 Die Radioaktivitäten wurden mit dem Omni-Guard, Low level background counting system (Tracerlab) bestimmt.
- 10.053 Die papierchromatographischen Trennungen erfolgten aufsteigend auf Papierstreifen der Firma Schleicher und Schüll, Papiersorte 2043 b. Als Systeme fanden Verwendung:
- a: Butanol / Eisessig / Wasser (20:3:7);
 - b: 3%ige wässr. Ammonchloridlösung;
 - c: 4%ige wässr. Natriumcitratlösung;
 - e: Propanol / 1%iger wässr. Ammoniak (2:1).
- Die Pterine können durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe (Hanau) auf dem Papier als blau fluoreszierende Flecke erkannt werden.
- 10.054 Die Crithidia-Teste wurden unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen (21) ausgeführt.
- 10.055 An weiteren wichtigen Geräten fanden Verwendung: Schüttelinkubator, Fraktionssammler, Rotationsverdampfer, Stoffwechselkäfig zur Untersuchung der Stoffwechselprodukte der Ratte, Perforatoren, Zentrifugen: Servall: Automatic-Servall Superspeed, Beckman/Spinco, Modell L.

10.056 Oxydation von Pterinen zur Pterin-Carbonsäure

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung einer Verbindung als 6-Polyhydroxyalkylpterin ist ihre Oxydation zur Pterin-Carbonsäure-(6). Die zu untersuchende Lösung wird in 0.1 n Natronlauge bei Zimmertemperatur so lange mit Permanganat behandelt, bis ein Überschuß an Permanganat das Ende

der Oxydation anzeigt. Darauf wird kurz im Wasserbad erhitzt und überschüssiges Permanganat durch Zugabe weniger Tropfen Methanol zerstört. Die Lösung wird anschliessend mit Salzsäure neutralisiert, von ausgeschiedenem Braunstein abfiltriert und auf eine kleine Ecteola-Säule aufgetragen. Mit Wasser werden die anorganischen Salze eluiert. Kurz hinter der Front wird bei Elution mit 5%iger Ameisensäure die vorhandene Carbonsäure erhalten. Die ameisensaure Lösung wird im Rotationsverdampfer zur Trockene einrotiert. In wenig Wasser aufgenommen, kann der Rückstand im Kolben auf Pterin-Carbonsäure untersucht werden.

10.057 Reinigung der Pterine über A-Kohle

Zur Isolierung von Pterinen aus Salzlösungen hat sich die Reinigung über mit 4 Gewichtsprozenten Stearinsäure desaktivierte A-Kohle (46) gut bewährt. Lösungen werden auf pH 4 gebracht und mit einigen Spatelspitzen desaktivierte A-Kohle versetzt. Nach 15 Minuten wird abfiltriert. Enthält die zurückbleibende Lösung noch fluoreszierende Stoffe, so wird sie nochmals mit A-Kohle behandelt. Die gesammelten A-Kohlefraktionen werden mit Wasser gut ausgewaschen und anschliessend mehrmals mit einer Lösung von konz. wässr. Phenol/konz. Ammoniakwasser 4:1 behandelt. Die an A-Kohle adsorbierten Heterocyclen werden dadurch desorbiert. Der erhaltene alkalische, phenolische Extrakt wird mit Wasser 1:1 verdünnt, auf einem Rotationsverdampfer wird 50% des Wassers abgezogen. Das Phenol wird im nächsten Schritt durch Perforieren mit Äther entfernt.

10.06 Aufarbeitung von Rattenlebern

10.061 Extraktion der Pterine

Die Gewinnung des mit Trichloressigsäure nicht fällbaren Anteiles erfolgt nach der Methode, nach der L. Buschmann aus Bienenpuppen den entsprechenden Extrakt gewann.

Das aus 250 g Rattenlebern angefallene Protein wurde mit 500 ml 5 n Salzsäure fünf Stunden unter Rückfluß gekocht. Aus diesem Hydrolysat wurden die Heterocyclen nach vorheriger Neutralisation mit Natronlauge und Einstellen auf pH 4 mit Essigsäure über desaktivierte A-Kohle nach 10.057 abgetrennt. Der erhaltene Extrakt wurde anschliessend in einer Dowex-Säule (1 X 8, Formiatform) aufgetrennt.

10.062 Chromatographie

Die Auftrennung der Extrakte auf die einzelnen Pterine erfolgte analog der Methode von L. Buschmann (29).

10.07 Inkubationsansätze (Standardansatz), Isolierung der Pterine

Je 1 g Rattenleber wurde in 6 ml des gewünschten Puffers (47) in einem 15 ml Potter-Elvehjem (42) (Firma Braun, Messungen) homogenisiert, anschliessend in einen Erlenmeyer überführt, mit dem zu inkubierenden Pterin (20-500 γ) und evtl. Zusätzen versetzt und aerob oder unter Stickstoff bei 37°C drei Stunden lang in einem Inkubator mechanisch geschüttelt. Nach Beendigung wurde das Protein durch kurzzeitiges Erhitzen auf 90°C denaturiert und abzentrifugiert. Durch kurzzeitiges Aufkochen des abzentrifugierten Proteins entweder mit Wasser oder 0.2 m Mercaptoäthanollösung (bei Arbeiten mit hydrierten Pterinen) wurde der Rest der Pterine von dem Protein heruntergewaschen. Die vereinigten Überstände wurden zunächst zur Abtrennung der Anionen über Ecteola (16 x 170 mm) chromatographiert. Den mit Wasser eluierbaren Anteil trennt man durch Rechromatographie über P-Cellulose (16 x 170 mm). Elutionsmedien waren bei beiden Austauschern nacheinander Wasser bzw. 0.2 m Mercaptoäthanollösung, 5%ige Ameisensäure und der Puffer aus 5% Ammonformiat in 5%iger Ameisensäure. Von den auf Fraktionssammlern aufgefangenen 18 ml-Fractionen wurden

0.5 ml plattiert und auf Radioaktivität untersucht. Zur Feinreinigung verwendet man besser 5 ml-Fraktionen, da dies eine exaktere Abtrennung von Begleitstoffen ähnlicher spezifischer Retentionsvolumina gestattet. Als Inkubationsmedien fanden Citrat-Phosphat-Puffer und Tris-Salzsäure (47) Verwendung.

10.08 Zellfraktionierung, Aufarbeitung der Enzyme

10.081 Gewinnung der Zellbestandteile

Frisch entblutete Rattenlebern werden in der fünffachen Menge 0.35 m Sucroslösung in einem 60 ml Potter-Elvehjem während zwei Minuten bei 1000 UpM unter Eiskühlung homogenisiert. In einer Servall-Zentrifuge werden in zehn Minuten bei 700 g die schweren Bestandteile, hauptsächlich Kerne und noch intakte Zellen, abgeschleudert. Aus dem Überstand werden in derselben Zentrifuge bei zehn Minuten Laufdauer bei 25.000 g die Mitochondrien isoliert.

Unter stetigem Rühren mit einem starken Magnetrührer wurde der Überstand langsam mit einer 0.2 m Sucroslösung 1:1 verdünnt und anschliessend noch 30 Minuten lang gerührt. Während 60 Minuten bei 85.000 g werden die Microsomen in einer Beckman/Spinco Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das Cytoplasma bildet einen Teil des Überstandes.

10.082 Butanolextraktion der Sedimente

Während die Microsomenfraktion isoliert wird, werden die "Kerne" mit doppeltem Volumen ihres Gewichtes 0.05 m Trispuffer pH 7.1 in einem vorgekühlten Potter-Elvehjem unter Eiskühlung homogenisiert und in ein Becherglas mit Magnetrührer überführt. Hierin läßt man 1/5 obigen Volumens auf -20°C vorgekühltes Butanol unter starkem Rühren an der Wand entlang einfließen und rührt anschliessend noch eine Stunde weiter.

Die dabei entstandene Suspension zentrifugiert man bei 13.000 UpM 30 Minuten in der Servall-Zentrifuge (Rotor SS 34). Dabei bilden sich vier Schichten. Die oberste Schicht bildet das Butanol, die zweite Schicht sind die Lipide plus Butanol. Die daran anschliessende Schicht enthält den wässrigen Butanolextrakt der Kerne. Am Boden des Zentrifugenglases haben sich die Zelltrümmer abgesetzt. Dieses Verfahren wird in gleicher Weise mit der Mitochondrien- und Microsomenfraktion wiederholt.

10.083 Konzentrierung der wässrigen Extrakte, Überführung in den zur Inkubation benötigten Puffer

Während der Zentrifugation der Butanolextrakte aus der Kerne- und Mitochondrienfraktion wird die Cytoplasmafraktion eingeengt. Dazu gibt man zu der Lösung bei 4°C Sephadex G-25 Coarse in fester Form und läßt das Gel quellen. Es nimmt viel Flüssigkeit und die darin enthaltenen niedermolekularen Bestandteile auf. Anschliessend wird auf einer vorgekühlten Fritte das verbleibende Proteinkonzentrat abgesaugt. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis auf 1 ml eingeengt ist.

Analog arbeitet man bei der Konzentrierung der Butanolextrakte aus den Zellpartikeln.

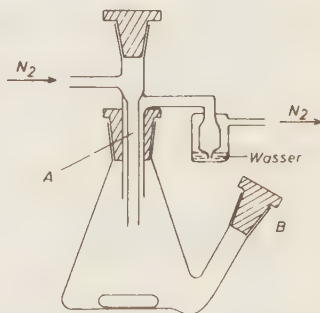
Zur Überführung des Enzymkonzentrates in den für die Inkubation benötigten Puffer hat man Sephadex-Säulen mit dem Material G-25 vorbereitet, das mit dem zur Inkubation verwendeten Puffer vorbehandelt ist. Auf diese Säulen gibt man die Enzymlösung und eluiert mit dem gewünschten Puffer. Die ersten zwei ml werden verworfen, die folgenden zwei ml enthalten die in den Zellpartikeln vorhandenen löslichen Enzyme.

10.084 Inkubation

Zu je zwei ml des eben erhaltenen Extraktes pipettiert man die zu inkubierenden Stoffe. Die weitere Ausführung des Ansatzes läuft analog 10.07.

10.09 Reduktion von Biopterin

3 μMol Biopterin werden in 4 ml Wasser in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben gelöst, der ein Arbeiten unter Stickstoff erlaubt (siehe Abbildung). Unter starkem Rühren mit einem Magnetrührer gibt man 32 mg NaBH_4 zu, schließt den Kolben mit dem Aufsatz und verdrängt alle Luft mit gereinigtem Stickstoff aus dem Kolben. Zweimal in Abständen von je 15 Minuten gibt man je 0.1 ml 1 n Salzsäure durch das absteigende Rohr A zu. Zum Zerstören überschüssigen Boranates wird 0.5 ml 1 n Salzsäure durch A eingipptiert zusammen mit 30 mg Mercaptoäthanol pro Inkubationsansatz. Falls es notwendig wird, unter Stickstoff Proben reduzierten Materials zu entnehmen, geschieht dies durch die Öffnung B, die normalerweise verschlossen ist.



10.10 Synthese der Lumazinderivate

Die Synthese des 6-Hydroxylumazins und des 6.7-Dihydroxylumazins wurde nach W. Pfeleiderer (38,41) durchgeführt. Die Reinigung des 6-Hydroxylumazins erfolgte durch Chromatographie auf Dowex 1 X 8, eluiert wurde mit 1%iger Ameisensäure. Durch Chromatographie über Ecteola-Cellulose bei Elution mit 0.1%iger Ameisensäure kann 6.7-Dihydroxylumazin in reiner Form erhalten werden.

Literaturverzeichnis

1. E.L.Patterson, H.T.Broquist, J.Amer.chem.Soc. 77, 3167
A.M.Albrecht, M.H.v. Saltza, (1955)
E.L.R. Stokstad

E.L. Patterson, R.Milstry, J.Amer.chem.Soc. 78, 5871
E.L.R. Stokstad (1956); 80, 2018 (1958)
2. Y.Mori, J.Matsumoto, T.Hama Z.vgl.Physiol. 43, 531 (1960)
3. T.Goto, T.Hama Proc.Imp.Acad.(Tokyo) 34,
724 (1958)

T.Hama, M.Obika Exp. 14, 182 (1958)
T.Hama, M.Obika Nature (London) 187, 326
(1960)
4. M.Viscontini, M.Schoeller, Helv.chim.Acta 38, 397
E.Loesser, P.Karrer, E.Hadorn (1955)

H.S.Forrest, H.K.Mitchell J.Amer.chem.Soc. 77, 4865
(1955)

M.Viscontini, E.Loesser, Helv.chim.Acta 38, 1222
P.Karrer, E.Hadorn (1955); 38, 2034 (1955)

M.Viscontini, A.Kühn, Z.Naturforsch. 11b, 501
A.Egelhaaf (1956)

G.H. Schmidt, M.Viscontini Helv.chim.Acta 45, 1571
(1962)
5. I.Cowperthwaite, M.M.Weber, Ann.N.Y.Acad.Sci. 56, 972
L.Packer (1953)

H.P.Broquist, A.M.Albrecht Proc.Soc.exp.Biol.Med. 89,
178 (1955)
6. H.Rembold, H.Metzger Hoppe-Seyler's Z.physiol.
Chem. 329, 291 (1962)

7. A.Butenandt, H.Rembold Hoppe-Seyler's Z.physiol.
Chem. 311, 79 (1958)
- 7a. H.Rembold Naturwiss. 51, 49 (1964)
8. H.Rembold, G.Hanser Hoppe-Seyler's Z.physiol.
Chem. 339, 251 (1964)
9. H.Wieland, Cl.Schöpf Chem.Ber. 58, 2178 (1925)
10. R.Purrmann Ann. 544, 182 (1940)
11. Cl.Schöpf, R.Reichert Ann. 548, 83 (1941)
12. H.S.Forrest, C.van Baalen, Arch.Biochem.Biophys. 78,
I.Myers 95 (1958)
- D.L.Hatfield, C.van Baalen, Plant Physiol. 36, 240 (1961)
 H.S.Forrest
13. H.Ziegler, I.Ziegler Z.Naturforsch. 10b, 642 (1955);
 I.Ziegler-Günder 11b, 493 (1956)
- I.Ziegler, H.Ziegler, Arch.Microbiol. 42, 80 (1962)
 H.Schmidt
14. I.Ziegler Z.Naturforsch. 15b, 460 (1960)
15. S.Kaufman J.biol.Chem. 236, 804 (1961)
16. H.Kraut, W.Pabst, H.Rembold, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
 L.Wildeman 332, 101 (1963)
17. H.G.Petering, I.A.Schmitt J.Amer.chem.Soc. 71, 3977 (1949)
18. H.Rembold, H.J.Schramm Chem.Ber. 96, 2786 (1963)
19. M.Viscontini, H.Raschig Helv.chim.Acta 41, 108 (1958)
20. R.Tschesche, B.Hess, Ann. 658, 193 (1962)
 I.Ziegler, H.Machleidt
21. G.^HHanser, H.Rembold Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
 319, 200 (1960)
22. H.Rembold, H.Metzger Chem.Ber. 96, 1395 (1963)

23. F.Korte, H.Barkemeyer Chem.Ber. 89, 2400 (1956);
 90, 392 (1957)
24. W.Traube Chem.Ber. 33, 1371 (1900)
25. C.K.Cain, M.F.Mallette,
 E.C.Taylor J.Amer.chem.Soc. 68, 1996
 (1946)
26. D.L. Mac Donald, H.O.L.
 Fischer J.Amer.chem.Soc. 74, 2087
 (1952)
27. H.Rembold Angew.Chem. 73, 543 (1961)
28. H.Rembold III.Internat.Pteridin-Symp.
 Stuttgart 1962, Perg.Press
 New York 1963, 3. 465
29. H.Rembold, L.Buschmann ebenda S. 243, Hoppe-Seyler's
 Z.physiol.Chem. 330, 132
 (1962), Ann. 662, 72 (1963)
 Dissertation München 1963
 L. Buschmann
30. S.Nawa Bull.chem.Soc.Japan 33, 1555
 (1960)
31. H.S.Forrest, S.Nawa Nature (London) 196, 372 (1962)
32. I.Ziegler, H.A.Nathan Z.Naturforsch. 10b, 260 (1961)
33. J.Kaufman J.biol.Chem. 237, PC 2712
 (1962)
34. H.C.S.Wood III.Internat.Pteridin-Symp.
 Stuttgart 1962
 V.R.Boon, T.Leigh J.chem.Soc.(London) 1951, 1497
35. M.Viscontini, H.Möhlmann Helv.chim.Acta 42, 1679 (1959)
 M.Viscontini, P.Karrer ebenda 40, 68 (1957)
 M.Viscontini ebenda 41, 1299 (1958), Farmaco
 (Pavia) Ediz.Sci. 18, 47 (1963)

36. H.Rembold, W.Gutensohn unveröffentlicht
37. T.Shiota, M.N.Disraely, J.biol.Chem. 239, 2259 (1964)
M.P. Mc Cann
38. W.Pfleiderer Chem.Ber. 90, 2604 (1957)
39. F.Korte, H.Bannuscher Ann. 622, 126 (1959)
40. W.S. Mc Nutt J.biol.Chem. 238, 1116 (1963)
41. W.Pfleiderer Chem.Ber. 90, 2631 (1957)
42. V.R.Potter, C.A.Elvehjem J.biol.Chem. 114, 495 (1936)
43. G.Schmidt The Nucleic Acids, Academic
Press Inc.Publ.New York,
Vol. I, 555 (1955)
44. B.Levenberg, O.Hayaishi J.biol.Chem. 234, 955 (1959)
45. Methoden der org. Chemie (Houben-Weyl), 4.Aufl. Bd. II,
S. 621, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953
46. A.Asatoor, C.E.Dalgliesh J.chem.Soc. (London) 1956, 2291
47. Colowick u. Kaplan Methods in Enzymology, Bd.II,
141
48. A.Roush, Earl R.Norris Arch.Biochem. 29, 344 (1950)

L e b e n s l a u f

Am 4. Juli 1938 wurde ich, Heinz Metzger, in Merseburg an der Saale geboren, als Sohn des Chemikers Dr. Hermann Metzger und seiner Frau Helga, geb. Stehr. Kriegsbedingt besuchte ich die Volksschulen in Zwentendorf (Niederösterreich), Grünthegernbach und Burgkirchen (Oberbayern).

1948 trat ich in das humanistische Gymnasium in Burghausen ein und wechselte ein Jahr später auf die Städtische Realschule über. Nach deren Ausbau zur Oberrealschule erhielt ich 1958 das Zeugnis der Reife.

Auf Grund meiner Zurückstellung vom Militärdienst konnte ich anschliessend im Wintersemester 1958 mein Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München beginnen. Im Mai 1960 legte ich dort die Diplomvorprüfung, im Juli 1961 die Diplomhauptprüfung ab.

Meine biologischen Interessen weiter auszubauen bewogen mich, am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Professor Dr. A. Butenandt meine Diplom- und Doktorarbeit durchzuführen. Hiermit war ich zwischen Januar 1962 und Februar 1965 beschäftigt.

